

In vitro Rekonstitution von Nukleosomen:
Einfluß der DNA-Sequenz auf die
Bindung der Histone

Winfried Linxweiler

Diss
München
1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

In vitro Rekonstitution von Nukleosomen:
Einfluß der DNA-Sequenz auf die Bindung der Histone

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Winfried Linxweiler
aus Werschweiler

München 1985

vorgelegt am 17. April 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Hörz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juni 1985

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München in der Zeit von Juni 1980 bis Dezember 1984 durchgeführt.

Herrn Prof. H.G. Zachau danke ich für die Förderung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Prof. W. Hörz für die Überlassung des Themas, seine Anleitung und Unterstützung.

Allen Kollegen, besonders Roland Lill, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden teilweise veröffentlicht:

Linxweiler, W. und Hörz, W., Nucl. Acids Research **10**, 4845-4859 (1982)

Linxweiler, W. und Hörz, W., Nucl. Acids Research **12**, 9395-9413 (1984)

Linxweiler, W. und Hörz, W., Cell **41**, August (1985) im Druck

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung und Problemstellung.....	1
2.	Ergebnisse.....	11
2.1.	Exonuklease III aus E.coli als Instrument zur Charakterisierung von rekonstituiertem Chromatin...	11
2.1.1.	Der Abbau von Maussatelliten DNA mit Exonuklease III liefert ein ungewöhnliches Fragmentmuster.....	13
2.1.2.	Untersuchung der Sequenzspezifität von Exonukle- ase III an pBR322-Restriktionsfragmenten.....	15
2.1.3.	Quantitative Analyse der Exonukleaseverdauung von synthetischen DNA-Substraten.....	20
2.1.4.	Stört die Sequenzspezifität von Exonuklease III die Untersuchungen an DNA-Histonkomplexen?.....	25
2.2.	Rekonstitution von Mononukleosomen.....	26
2.2.1.	Charakterisierung von rekonstituierten Nukleosomen- kern-Partikeln durch die Nukleoproteingel- elektrophorese.....	26
2.2.2.	Die Rekonstitution von Nukleosomen ist abhängig von der Größe und Sequenz der DNA.....	29
2.2.3.	Analyse der rekonstituierten Partikel M1, M2 und M3 mit Exonuklease III.....	33
2.3.	Die Bestimmung der Nukleosomenpositionen, die in vitro auf Maussatelliten DNA erhalten werden.....	38
2.3.1.	Rekonstitution von monomerer Maussatelliten DNA mit Histonen und Isolierung der mononukleo- somen Partikel.....	38
2.3.2.	Die Analyse von drei rekonstituierten Monomeren der Satelliten DNA zeigt, daß die internen Nu- kleosomenpositionen von der DNA-Sequenz bestimmt werden.....	42
2.3.3.	Die eindeutige Bestimmung der Nukleosomenpositio- nen durch die selektive Markierung der Satelliten DNA an einem Ende.....	45

2.3.4.	Homologe und heterologe Histone binden auf der Maussatelliten DNA an die gleichen Positionen.....	49
2.3.5.	Multiple spezifische Nukleosomenpositionen werden in vitro auch mit prokaryontischen DNA-Fragmenten erhalten.....	50
3.	Diskussion.....	54
3.1.	Worauf beruhen die Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der die Nukleotide durch Exonuklease III abgespalten werden?.....	56
3.2.	Die Rekonstitution von Mononukleosomen und ihre Charakterisierung.....	58
3.3.	DNA-Fragmente definierter Sequenz können zu Nukleosomen mit spezifischen internen Positionen rekonstituiert werden.....	63
3.4.	Der Vergleich der in vitro und in vivo erhaltenen Resultate zeigt, daß die Anordnung der Nukleosomen in vivo weitgehend von der DNA-Sequenz bestimmt wird.....	65
3.5.	Die Endpositionen der Nukleosomen in vitro werden von der DNA-Sequenz und dem DNA-Endeffekt bestimmt.....	68
3.6.	Was ist die strukturelle Basis der Nukleosomenpositionierung im Maussatellitenchromatin in vitro?.....	71
3.7.	Über den Mechanismus der Nukleosomenpositionierung in vivo.....	76
3.8.	Mögliche biologische Bedeutung von spezifischen Nukleosomenpositionen.....	78
4.	Materialien und Methoden.....	81
4.1.	Enzyme.....	81
4.2.	DNA.....	81
4.3.	Radioaktive Markierung und Gelelektrophorese der DNA.....	82
4.4.	Markierung von pBR322-Fragmenten an einem 5'-Ende..	82

4.5.	Markierung von monomerer Maussatelliten DNA an einem 5'-Ende.....	83
4.6.	Die Präparation oligomerer synthetischer DNA.....	83
4.7.	Die Gleichungen, die den Abbau eines DNA-Fragmentes mit Exonuklease III beschreiben.....	84
4.8.	Die Isolierung von DNA-Fragmenten mit der präparativen Gelelektrophorese.....	85
4.8.1.	DNA-Fraktionen aus Kalbsthymus.....	85
4.8.2.	145 bp DNA aus Hühnererythrozyten.....	85
4.9.	Die Isolierung der Histone H2A+H2B und H3+H4.....	86
4.10.	Die Isolierung von Histon H1-freien Mononukleosomen.....	86
4.11.	Die Rekonstitution von Nukleosomen.....	87
4.11.1.	Rekonstitution mit unmarkierter DNA.....	87
4.11.2.	Rekonstitution mit radioaktiv markierter DNA.....	87
4.12.	Nukleoproteingelelektrophorese.....	90
4.13.	Die Isolierung rekonstituierter Partikel aus dem Nukleoproteingel.....	90
4.14.	Nukleaseabbau von DNA und rekonstituierten Mononukleosomen.....	91
5.	Zusammenfassung.....	92
6.	Literaturverzeichnis.....	97
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	104
	Lebenslauf	

1. Einleitung und Problemstellung

Die Desoxyribonukleinsäure eukaryontischer Organismen steht in der Zelle mit einer großen Zahl von Proteinen in Wechselwirkung, von denen mit weitem Abstand die Histone, eine Gruppe von fünf relativ kleinen basischen Proteinen, am häufigsten vorkommen. Ihre Masse entspricht etwa derjenigen der DNA im Zellkern. Sie neutralisieren die Desoxyribonukleinsäure und verpacken sie gleichzeitig. Dadurch kann der DNA-Strang eines Säuger-Genoms, der etwa ein Meter lang ist, auf die Größe eines Zellkerns von einigen μm Durchmesser zusammengepackt und im Verlaufe der Zellteilung in den Chromosomen weiter kondensiert werden. Dieser Komplex der DNA mit den Histonen ist der Hauptbestandteil des Chromatins. Es ist, wie man vor etwa 10 Jahren fand, aus Nukleosomen aufgebaut (1-4). Das Nukleosom als Grundeinheit des Chromatins enthält in Abhängigkeit von der Art des Organismus und des Gewebes 165-255 bp (im Durchschnitt 200 bp) DNA. Es hat die Form eines flachen Zylinders mit der Abmessung $110 \times 50 \text{ \AA}$, und sein Kern besteht aus acht Histonen, je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4, die deshalb auch Nukleosomenkernhistone genannt werden. Um dieses Histonoktamer ist die DNA in $1\frac{3}{4}$ Windungen, das entspricht 145 bp, herumgewickelt. Im Chromatin sind die Nukleosomen wie die Perlen einer Kette aneinander gereiht mit im Durchschnitt 55 bp DNA zwischen den Nukleosomenkernen. Diese DNA, die nicht direkt an die Kernhistone gebunden ist, wird als Linker bezeichnet. Zusätzlich zu den Kernhistonen findet man im Chromatin das Histon H1 mit den Nukleosomen assoziiert, welches hilft, die Perlenkette in Strukturen höherer Ordnung und Kondensation zu falten (siehe Abb.1).

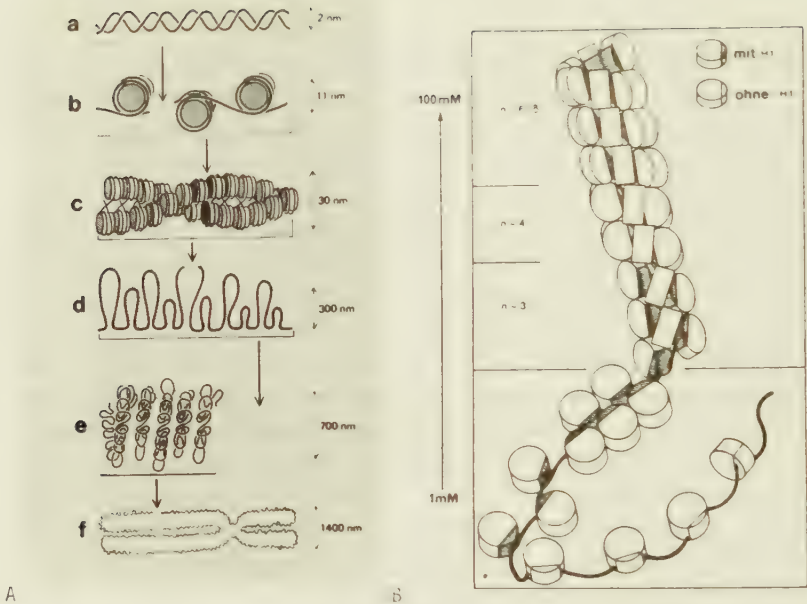


Abb.1 Die Organisation des Chromatins im Zellkern.

A. Die Verpackung der DNA Doppelhelix (a) durch die Histone, wie man sie sich heute vorstellt, ist gezeigt. In (b) sind drei Nukleosomen zu sehen, in denen die DNA zweimal um den Histonkern gewickelt ist. Die Nukleosomenkette wird weiter in der 30 nm Fiber organisiert (c, ein mögliches Modell). Sie liegt im Zellkern in Schleifen an die Kernmatrix angeheftet vor (d). Wie diese "Chromatindomänen" sich dann zum Chromosom zusammensetzen könnten, ist in (e) und (f) gezeigt (aus: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing Inc., New York, 1983).

B. Das Modell zeigt, wie die Nukleosomen unter dem Einfluß der Ionenstärke und in Gegenwart von Histon H1 sich zu einer Spirale mit 6-8 Nukleosomen pro Windung organisieren (Solenoidmodell der 30 nm Fiber, entspricht (c) in Abb.1A, aus: Thoma, F., Koller, Th. und Klug, A. (1979) J. Cell. Biol. 83, 403).

Nach der Nukleosomenkette von 11 nm Durchmesser ist die nächsthöhere Organisationsstufe des Chromatins die 30 nm Fiber, von deren Aufbau es mehrere Modelle gibt (5-7, Abb.1). Die 30 nm Fiber scheint im Abstand von 40-100 kb an eine Kernmatrixstruktur angeheftet zu sein, wodurch sich Schleifen ausbilden, die man als Chromatindomänen bezeichnet (8-11). Man stellt sich vor, daß durch weitere Auffaltung solcher Strukturen die Einheitsfibrille von 300-400 nm Durchmesser entsteht, die ihrerseits schraubenförmig aufgewunden das Chromatid eines Chromosoms bildet (Abb.1).

Das Verständnis der Genregulation ist eine zentrale Frage der heutigen Molekularbiologie. Erkennt man, durch welche Mechanismen ein bestimmtes Gen von vielen möglichen in der Zelle ausgewählt wird, exprimiert zu werden, ist damit auch eine wesentliche Fragestellung der Zelldifferenzierung gelöst, die ein grundlegendes Phänomen des vielzelligen Organismus ist. Die Spezifität der Genregulation macht das Beispiel der Globingene deutlich. Über 90% der mRNA in den Vorläuferzellen der Erythrozyten werden vom α und β -Globingen transkribiert. Erstaunlich ist dabei, daß diese gewaltige Menge an Genprodukt von jeweils nur einer Genkopie abstammt, welche nur etwa 1 Millionstel der DNA ausmacht, die im Zellkern vorhanden ist. Diese Aktivierung findet nur im hämatopoetischen System statt, obwohl beide Gene in jeder Körperzelle vorhanden sind.

Die Steuerung dieser Prozesse ist weitgehend unbekannt. Der Unwissenheit über die Genregulation in Eukaryonten stehen die klaren Vorstellungen der Regulation bei prokaryontischen Organismen gegenüber, wie sie sich im Operonmodell von Jacob und Monod darstellen (12). In diesem Modell besitzt ein bakterielles Gen ein zusätzliches Regulatorgen, welches einen Repressor kodiert. Dieses Repressormolekül besetzt die DNA vor der Bindungsstelle der RNA-Polymerase und verhindert damit die Transkription des Gens.

Erst auf ein Signal, z.B. Bindung eines bestimmten Substrates an den Repressor, gibt dieser den Weg zur Transkription frei. Man nennt diesen Vorgang auch negative Regulation. Wird ein Gen erst dann transkribiert, wenn ein Regulatorprotein bindet, spricht man von positiver Regulation. Für die eukaryontische Zelle ist diese Art der Regulation wahrscheinlich, da es bei dem um den Faktor 1000 gegenüber dem prokaryontischen Organismus größeren Genom ökonomischer erscheint, Gene spezifisch zu aktivieren als die übrige DNA zu inaktivieren. Proteine mit dieser Aufgabe werden auch in der Eukaryontenzelle gesucht, jedoch weiß man darüber erst wenig. Es finden sich aber bei den meisten bisher untersuchten Genen an ihrer 5'-Flanke Sequenzen, welche für eine regulierte Transkription notwendig sind und die solche Bindungsstellen für Regulatorproteine darstellen könnten.

Wie weit spielt die Chromatinstruktur eine Rolle bei der Regulation der eukaryontischen Genexpression? Im Säurgenom liegt praktisch alle DNA in Nukleosomenstruktur vor, und es erhebt sich die Frage, wie diese DNA transkribiert werden kann, wenn die Nukleinsäure fest an basische Proteine gebunden und dabei eng um sie herumgewickelt ist. Frühere Experimente ließen vermuten, daß durch die Bindung von Histonen an die DNA die genetische Information nicht mehr zugänglich ist, das Histonprotein also als Repressor wirkt (13). Jedoch zeigen Ergebnisse in neuerer Zeit, daß die Funktion der DNA durch die Bindung von Histonen nicht eingeschränkt zu werden braucht und darüberhinaus die Nukleosomenstruktur möglicherweise an der Regulation der Transkription mitbeteiligt ist (14,15). Es wurde mit unterschiedlichen Methoden immer wieder gefunden, daß sich das aktive Gen vom inaktiven in der Struktur seines Chromatins unterscheidet. So zeigen Experimente mit verschiedenen Nukleasen, daß im Chromatin vorzugsweise die DNA abgebaut wird, die gerade aktiv ist. Daraus kann man schließen, daß

aktiv transkribiertes Chromatin im Unterschied zum übrigen Chromatin in einer aufgelockerten Struktur vorliegt. Das transkribierte Chromatin zeigt außerdem charakteristische hypersensitive Stellen gegenüber DNAase I, welche mit der Aktivität der Gene korrelieren. Weiterhin machen Restriktionsenzyme auf aktiven Genen im Zellkern ein anderes Spaltmuster als auf inaktiven (s. Ref.15 als Übersicht). Diese Eigenschaften müssen abhängig sein von der Proteinbedeckung und der Struktur der Nukleosomen, da die DNA im aktiven wie inaktiven Zustand praktisch identisch ist. Man spricht allgemein auch von aktivem und inaktivem Chromatin.

Wie die Chromatinaktivierung im einzelnen abläuft, ist bisher noch nicht geklärt. Wahrscheinlich ist, daß abgesehen von der Änderung der allgemeinen Überstruktur die Struktur der Nukleosomen selbst in die Funktion des aktiven Chromatins mit einbezogen ist. Es wird in den letzten Jahren die Möglichkeit diskutiert, ob die Position der Nukleosomen auf der DNA dabei eine Rolle spielt. Ursprünglich war die Existenz von spezifischen Nukleosomenpositionen umstritten. Man glaubte, Nukleosomen seien statistisch über die genomische DNA verteilt und könnten jeden Platz einnehmen unabhängig von der Sequenz der DNA. Dies ist einleuchtend, muß doch praktisch alle DNA im Zellkern, die Millionen verschiedener Sequenzen umfaßt, in Nukleosomen verpackt werden, und es sollte deshalb eine spezifische Erkennung von bestimmten Sequenzen durch das Histonoktamer keine Rolle spielen. Diese Vorstellung änderte sich, als man die Positionen von Nukleosomen auf spezifischen DNA-Sequenzen untersuchte und immer mehr Beispiele für Nukleosomen fand, die nicht zufällig auf der DNA verteilt sind, sondern bestimmte Positionen einnehmen (15-17). Diese spezifische Nukleosomenpositionierung, im englischen Sprachgebrauch auch "phasing" genannt, wurde sowohl auf repetiti-

ver Satelliten-DNA (18-21) als auch auf Gensequenzen gefunden und mit der Regulation der Gentranskription in Verbindung gebracht (22-29).

Die Gründe, die im Chromatin zum Abweichen von einer statistischen Nukleosomenverteilung führen, sind bisher nicht bekannt. Mehrere Mechanismen werden diskutiert, wie Nukleosomen definierte Plätze einnehmen können. Kornberg (30) sieht eine solche Möglichkeit als Folge der spezifischen Bindung eines Proteins an die DNA gegeben. Dadurch, daß die Anwesenheit des Proteins die Bildung von Nukleosomen an dieser Stelle ausschließt, direkt daneben aber erlaubt, kann es in der Umgebung dieses Proteins zu einer geordneten Nukleosomenverteilung kommen. Eine andere Möglichkeit zeigen Strauss und Varshavsky auf, die sie mit Untersuchungen an Satellitenchromatin der Grünen Meerkatze belegen (31). Sie isolierten ein Nichthistonprotein, das spezifisch an die Satelliten-DNA bindet und postulieren, daß dieses Protein mit den Nukleosomen im Chromatin in Wechselwirkung tritt und ihre spezifischen Positionen vermittelt. Es wurde deshalb "phasing"-Protein genannt und soll für die Nukleosomenanordnung, wie sie auf der Satelliten-DNA der Grünen Meerkatze gefunden wurde (19), verantwortlich sein. In vitro Experimente, bei denen aus Histonen und DNA-Fragmenten Nukleosomen rekonstituiert worden sind, haben eine weitere Möglichkeit aufgezeigt, wie spezifische Positionierung entstehen kann. Mehrere Autoren fanden mit gereinigter SV40 DNA (32), mit kurzen DNA-Fragmenten aus E.coli (33,34) oder aus Seeigel (35), daß Nukleosomen auch ohne spezifische Hilfsproteine definierte Positionen einnehmen können. Es wurde der Schluß gezogen, daß die Histone in gewissem Umfang eine Sequenzpräferenz aufweisen. Allerdings gibt es bisher zu keiner der in vitro rekonstituierten eukaryontischen Sequenzen Informationen über die Nukleosomenpositionen in vivo (prokaryontische DNA liegt in

der Zelle nicht in Nukleosomenstruktur vor).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Gründe, die im Chromatin zum Abweichen von einer statistischen Nukleosomenverteilung führen, zu untersuchen. Alle Faktoren, die ursächlich für die gefundenen spezifischen Nukleosomenpositionen in Betracht kommen, wie die DNA-Sequenz, spezifische Modifikationen der Histone, Nichthistonproteine und andere, müssen dazu möglichst voneinander getrennt untersucht werden. Dies ist nur im *in vitro* System möglich, in dem aus DNA und Histonen Nukleosomen rekonstituiert werden und anschließend der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Nukleosomenpositionen getestet werden kann. Solche Rekonstitutionsexperimente sollten am Beispiel der Satelliten DNA aus der Maus durchgeführt werden. Diese DNA bot sich deshalb an, weil die Nukleosomenpositionen im nativen Satellitenchromatin sehr genau bekannt waren. Bezogen auf die Repetitionseinheit können Nukleosomen im nativen Chromatin eine begrenzte Anzahl verschiedener Positionen einnehmen, die alle sehr präzise festgelegt sind (19). Der Vergleich der *in vitro* erhaltenen Positionen mit der *in vivo* Nukleosomenanordnung sollte es erlauben, den Einfluß der DNA-Sequenz auf die Nukleosomenpositionen im nativen Chromatin zu bestimmen.

Die Satelliten DNA der Maus gehört zu einer besonderen Art von repetitiver DNA, die vor mehr als 20 Jahren entdeckt wurde (36-38). Solche DNA kommt in unterschiedlichen Mengen im eukaryontischen Genom vor und besteht aus Einheiten mit einer Länge von wenigen bis über tausend Basenpaaren, die in Serie wiederholt angeordnet sind. Diese hochrepetitive DNA kommt in den Chromosomen im Zentromer oder Telomer vor und stellt den Hauptanteil am sogenannten konstitutiven Heterochromatin des Zellkerns. Bei der Maus macht sie etwa 8% der Gesamt-DNA aus und besteht aus einem 234 bp großen Monomeren, das ungefähr 1 Million mal wieder-

holt ist. In der hochrepetitiven DNA sind weder Gene enthalten noch wird sie in mRNA überschrieben, und bis heute konnte ihr keine eindeutige Funktion zugeordnet werden (37,39,40).

Schon länger ist bekannt, daß sich aus DNA und Histonen Nukleosomen rekonstituieren lassen, die in ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften nicht von natürlichen Nukleosomen zu unterscheiden sind (15). Allerdings führt das einfache Zusammenmischen der Komponenten nicht zu Nukleosomen, sondern zu unspezifisch an die DNA assoziierten Histonkomplexen, die sogleich präzipitieren. Nukleosomen wurden erst mit einer Salzdialysemethode erhalten, bei der in Gegenwart von 2M NaCl DNA und Histone gemischt werden (unter diesen Bedingungen liegen sie nicht aneinander gebunden vor) und sich unter kontinuierlicher Entfernung des NaCl mittels Dialyse Nukleosomen ausbilden (41-43). Diese Rekonstitution ist die gebräuchlichste und auch in dieser Arbeit angewendete Methode. Eine zweite Art der Rekonstitution erfolgt unter physiologischen Salzkonzentrationen, und es werden sogenannte "assembly" Faktoren verwendet wie RNA bestimmter Größe, Polyglutaminsäure oder das Protein Nukleoplasmin, die eine unspezifische Aggregation von DNA und Histon verhindern sollen. Mit einer dritten Methode, die aber im eigentlichen Sinne nicht mehr zur in vitro Rekonstitution gezählt werden kann, läßt sich Chromatin aus isolierter DNA erhalten, indem diese DNA in *Xenopus*-Oozyten eingespritzt wird (für eine Übersicht siehe 44).

In dieser Arbeit sollte über die Rekonstitution von Nukleosomen hinaus der Einfluß der DNA-Sequenz auf die Nukleosomenpositionen untersucht werden. Schon früher war gezeigt worden, daß sich bei der Rekonstitution großer DNA die Nukleosomen in enger Nachbarschaft ausbilden (45-47). Damit bestand die Gefahr, daß die Positionen nicht nur von

Histon-DNA Wechselwirkungen, sondern auch durch Kontakte zwischen benachbarten Histonoktameren bestimmt würden. Es erschien deshalb angezeigt, für die geplanten Rekonstitutionsexperimente DNA einzusetzen, die nicht mehr als ein Histonoktamer aufnehmen kann. Dies entspricht etwa einer DNA-Größe von 260 bp (48). Andererseits bindet ein Histonoktamer an einen 145 bp Abschnitt auf der DNA. Um also die Möglichkeit verschiedener Nukleosomenpositionen bei der Rekonstitution zuzulassen, mußte DNA eingesetzt werden, die größer als 145 bp war. Nachdem bisher das Verhalten von DNA-Fragmenten im Größenbereich von 145 bp - 260 bp bei Rekonstitutionsexperimenten nicht bekannt war, galt es zunächst zu klären, ob ein Rekonstitutionsansatz mit DNA dieser Größe Auskunft über spezifische Nukleosomenpositionen geben konnte.

Ein weiteres Problem ergab sich aus der Analyse der zu erwartenden Nukleosomenpositionen. Als empfindlichste Methode hatte sich in der Vergangenheit die Verdauung mit Exonuklease III aus *E. coli* erwiesen (33,49). Dieses Enzym bindet nur an doppelsträngige DNA und baut dabei jeden Strang vom 3'-Ende her Nukleotid für Nukleotid ab (50,51). Der Abbau stoppt, wenn der doppelsträngige Bereich zu Ende ist oder die DNA durch ein an sie gebundenes Protein geschützt wird. So zeigte sich auch für das Nukleosom, daß durch die Wechselwirkung der Histone mit der DNA ein starkes Hindernis für die Exonuklease gegeben ist (49,52). Allerdings erwies es sich als nötig, den Wirkungsmechanismus des Enzyms genauer zu untersuchen und vor allem sicherzustellen, daß nicht eine zu starke Sequenzspezifität ihre Verwendung in Frage stellt, wie es z.B. für die *Micrococcus*-Nuklease gefunden wurde (53,54).

Sobald ein geeignetes Rekonstitutionssystem zur Verfügung stand, sollte untersucht werden, ob Histonoktamere *in vitro* sequenzspezifisch an Maussatelliten DNA binden.

Ziel dieser Versuche war es, Auskunft darüber zu geben, ob sequenzspezifische Histon-DNA Wechselwirkungen für die in vivo gefundenen Nukleosomenanordnung im Satellitenchromatin verantwortlich sind, oder aber andere Faktoren im Zellkern eine Rolle spielen.

2. Ergebnisse

Exonuklease III aus *E.coli*, ursprünglich von Richardson und Kornberg (50,56) als DNA 3'-Phosphatase entdeckt, ist eine doppelstrangspezifische 3'-5' Exodesoxyribonuklease, die vor allem für DNA-Sequenzierung und zur Untersuchung von DNA-Protein Wechselwirkungen Verwendung findet. Das Enzym verdaut die DNA beginnend von den beiden 3'-Enden nonprozessiv, d.h. nach jedem abgespaltenen Nukleotid löst sich die Enzym-DNA-Bindung und muß sich für den nächsten Schritt wieder neu bilden (50). Dieser Vorgang wiederholt sich synchron auf den beiden Strängen, bis die Mitte des DNA-Moleküls erreicht ist und der Komplex auseinander fällt. Es liegen dann zwei etwa gleich lange Einzelstränge vor, die kein Substrat mehr für die doppelstrangspezifische Exonuklease sind (s. Abb.2).

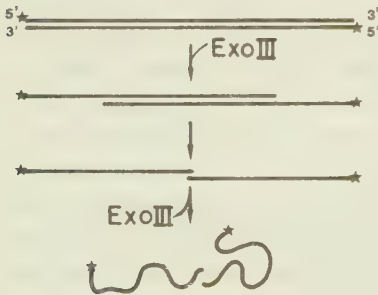


Abb.2 Die Verdauung eines DNA-Fragmentes mit Exonuklease III aus *E.coli*. Ein DNA-Fragment mit einer radioaktiven Markierung an beiden 5'-Enden (*) ist gezeigt. Exonuklease III bindet an die Enden und beginnt vom 3'-Ende her jeden Strang Nukleotid für Nukleotid zu verkürzen, während das 5'-Ende nicht angegriffen wird. Am Ende der Verdauung liegen zwei etwa gleich lange am 5'-Ende markierte Einzelstränge vor.

Proteinmoleküle, die an DNA binden, können die Exonuklease hemmen, so daß der exonukleolytische Abbau der DNA am Rande der Bindung zum Erliegen kommt und damit die Grenzen der Wechselwirkung von DNA und Protein angegeben werden. Auf

diese Weise konnte z.B. der DNA-Bereich genau bestimmt werden, an den das SV-40 Antigen (57) oder die -Integrase (58) bindet. Riley und Weintraub (49) konnten zeigen, daß es mit Hilfe des Enzyms möglich ist, auch die Histon-DNA Wechselwirkung im Nukleosom zu untersuchen und Kornberg und Prunell (52) entwickelten ein Verfahren, das mit Hilfe von Exonuklease III und Nuklease S1 ermöglicht, exakt die an das Histonoktamer im Nukleosom gebundene DNA von 145 bp darzustellen. Dieses Verfahren und die Exonuklease III selbst stellen heute eine wichtige Methode dar, um die Struktur von nativen (19,20,59-61) und rekonstituierten (33) Nukleosomen zu bestimmen. Bislang wurden Strukturuntersuchungen an Chromatin vornehmlich mit Micrococcus-Nuklease, einer Endonuklease aus Bakterien, und Desoxyribonuklease I aus Pankreas durchgeführt. Die Micrococcus-Nuklease spaltet Chromatin nur zwischen den Nukleosomen, und es sollte somit indirekt möglich sein, ihre Positionen zu bestimmen. Bei intensiver Verdauung mit diesem Enzym wird alle DNA zwischen den Nukleosomen abgebaut und man erhält Nukleosomenkerne. Allerdings wurden Arbeiten über spezifische Positionierung von Nukleosomen in aktivem und inaktivem Chromatin in Frage gestellt, als man erkannte, daß dieses Enzym an bestimmten Sequenzen der DNA präferentiell spaltet und selbst intranukleosomal diese Sequenzen schneller spaltet als weniger bevorzugte Spaltstellen der DNA zwischen den Nukleosomen (53,54,62). Dies bedeutet auch, daß bereits DNA, ohne an Histone gebunden zu sein, charakteristische Spaltmuster zeigt, die sich von denen des Chromatins oft kaum unterscheiden. Damit werden zuverlässige Aussagen über die Lage der Nukleosomen wesentlich erschwert. Von einigen Autoren wurde auch für die Exonuklease III eine gewisse Sequenzspezifität vermutet (33,57,63), so daß es notwendig war, dieses Enzym daraufhin genauer zu untersu-

chen, vor allem, um die Aussagekraft der Analyse von Chromatin mit diesem Enzym genau bewerten zu können.

2.1.1. Der Abbau von Maussatelliten DNA mit Exonuklease III liefert ein ungewöhnliches Fragmentmuster

Das 234 bp lange Monomer der Maussatelliten DNA, welches als Substrat für die Rekonstitution verwendet werden sollte, verhielt sich in einer Kontrollverdauung mit Exonuklease III ungewöhnlich. Anstatt kontinuierlich verkürzt zu werden und am Ende der Verdauung zwei gleich lange Fragmente von etwa halber ursprünglicher Länge zu ergeben (s. Abb.2), erscheinen im Verlaufe der Verdauung einige definierte Bruchstücke, und das Endmuster besteht aus DNA-Fragmenten von etwa 80 und 145 bp Länge (Abb.3A). Es war denkbar, daß entweder eine spezielle Sequenz, die das Enzym stark verlangsamt, verantwortlich ist für das unerwartete Endmuster oder daß beide Stränge über ihre ganze Länge unterschiedlich schnell abgebaut werden. Da die DNA an beiden 5'-Enden mit ^{32}P markiert worden war, können die Fragmente in Abb.3A nicht eindeutig einem der beiden Stränge zugeordnet werden. Deshalb wurde der Versuch wiederholt mit DNA, die nur am 5'-Ende des A-reichen oder am 5'-Ende des T-reichen Stranges markiert worden war. Wie in Abb.3B zu sehen ist, wird der A-reiche Strang des Monomeren etwa doppelt so schnell abgebaut wie der komplementäre T-reiche Strang. Des weiteren läßt der unregelmäßige Verlauf der Verdauung auf eine gewisse Sequenzspezifität des Enzyms schließen, d.h. die Exonuklease III spaltet nicht jede Phosphodiesterbindung gleich schnell.

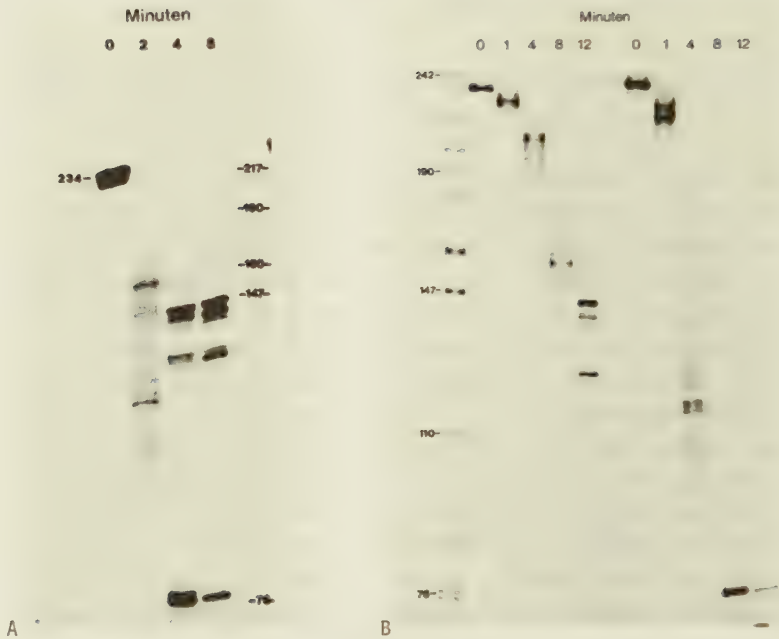


Abb.3 Die Verdauung der Maussatelliten DNA mit Exonuklease III ergibt ein ungewöhnliches Endmuster.

A. Das an beiden 5'-Enden markierte Satellitenmonomer (Eco RII, 234 bp) wurde mit Exonuklease III (1,2 E/ μ g DNA) für die angegebenen Zeiten verdaut. Die DNA Fragmente wurden denaturiert und ihre Größe wurde auf einem 6% Sequenzgel analysiert. Gezeigt ist ein Autoradiogramm. Als Längenreferenz wurden die an ihrem 5'-Ende markierten Fragmente der HpaII Verdauung von pBR322 verwendet. Die Größen einiger Fragmente sind am linken Rand in Nukleotiden angegeben. B. Die monomere Maussatelliten DNA wurde am linken Ende (A-reicher Strang, rechts im Bild) bzw. am rechten Ende (T-reicher Strang, links im Bild) radioaktiv markiert und mit Exonuklease III inkubiert (0,4 E/ μ g DNA).

2.1.2. Untersuchung der Sequenzspezifität von Exonuklease III an pBR322-Restriktionsfragmenten

Um zu sehen, ob das ungewöhnliche Endmuster der Satelliten DNA nach Exonukleaseverdauung eine besondere Eigenschaft dieser repetitiven DNA ist und um die Ursache des ungleichmäßigen Abbaus zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit Restriktionsfragmenten des Plasmids pBR322 gemacht. Diese Fragmente wurden so präpariert, daß jeweils nur ein 5'-Ende eine radioaktive Phosphatgruppe trug, damit die während des enzymatischen Abbaus entstehenden Fragmente eindeutig einem Strang zugeordnet werden konnten. Aus dem Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, PstI, BamHI bzw. RsaI drei Fragmente erhalten, die selektiv an einem 5'-Ende radioaktiv markiert wurden. Die Muster der Exonukleaseverdauung dieser DNA sind in Abb.4 und Abb.5 gezeigt, wo jeweils Strang und Gegenstrang zu sehen sind. Man erkennt, daß der Abbau beider DNA-Stränge des 239 bp PstI/RsaI und des 210 bp RsaI/BamHI Fragmentes mit identischer Geschwindigkeit verläuft und etwa gleich große DNA-Fragmente liefert, was für das 160 bp RsaI/EcoRI Fragment nicht zutrifft (dieses Endmuster besteht aus Fragmenten von 100 bzw. 70 bp Länge) und somit ähnlich wie bei der Maussatelliten DNA ein unterschiedlich schneller Abbau der beiden DNA-Stränge stattfindet. Diese Analysen zeigen des weiteren, daß nicht alle im Laufe der Verdauung entstehenden Fragmente ähnlich stark vertreten sind. Um sie in ihrer Größe genau zu bestimmen, wurde eine Längenanalyse mittels der Sequenzgelelektrophorese durchgeführt. Als Beispiel zeigt Abb.5 den Zeitablauf einer Exonukleaseverdauung des 210 bp langen RsaI/BamHI Fragmentes. Der Abbau beider Stränge ergibt prominente Banden und deutliche Lücken in der Serie der Abbaufragmente. Dies bedeutet, daß das Nukleotid am 3'-Ende der prominenten Fragmente langsamer als der Durchschnitt abgespalten wird, während die Lücken im

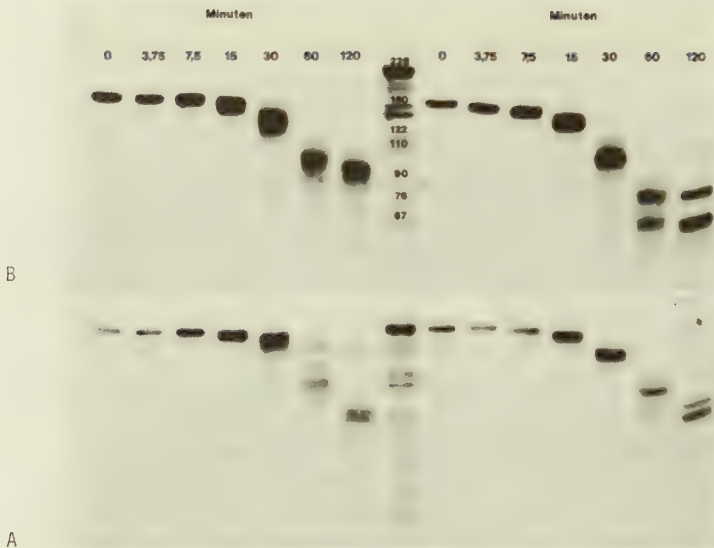


Abb.4 Die Analyse komplementärer Stränge von zwei pBR322-Fragmenten mit Exonuklease III.

A. Der Abbau des 163 bp EcoRI/RsaI Fragmentes (Position 4361-164 in der pBR322 Sequenz(64)) erfolgte mit Exonuklease III (0.05 E/ μ g DNA) für die im Bild angegebenen Zeiten. Links ist die DNA, die am EcoRI-Ende markiert ist, gezeigt, rechts die am RsaI-Ende markierte DNA. Die Längenanalyse der Fragmente erfolgte mit einem 5% PAA-Gel mit 8 M Harnstoff.

B. Der Abbau des 239 bp PstI/RsaI Fragmentes (Position 3608-3846). Links ist die DNA, die am PstI-Ende markiert ist, rechts die am RsaI-Ende markierte DNA gezeigt. Die Verdauung und die Elektrophorese erfolgte wie in A.

Muster daher rühren, daß das betreffende Nukleotid besonders rasch abgedaut wird. Abb.5C gibt die Sequenz des 210 bp Fragmentes an und zeigt die Positionen der rasch und langsam gespaltenen Phosphodiesterbindungen an. Das Ergebnis solcher Analysen, durchgeführt an allen drei pBR322 DNA-Fragmenten, ist in Abb.6 zusammengefaßt. Sie zeigt alle 16 möglichen Dinukleotidbindungen einer DNA, die im Verlaufe einer Exonukleaseverdauung gespalten werden und von denen das 3'-ständige Nukleotid freigesetzt wird.

Abb.5 Die Analyse der Exonukleaseverdauung mit der Sequenzgelelektrophorese erlaubt die Bestimmung der langsam und schnell abgespaltenen Nukleotide. Das 210 bp RsaI/BamHI-Fragment (Position 164-375 in der pBR 322-Sequenz (64)) wurde am RsaI-Ende (A) oder am BamHI-Ende (B) markiert und mit Exonuklease III für die im Bild angegebenen Zeiten verdaut (0,05 E/ μ g DNA). Die Proben wurden in einem 8% Sequenzgel analysiert. Die Längenangaben resultieren aus dem Vergleich mit dem purinspezifischen Abbau des Fragmentes (65). Das Muster nach 120 Min Verdauung entspricht dem Endmuster (eine längere Inkubation ergibt keine weitere Änderung). In C ist die Sequenz des Fragmentes gezeigt und die Phosphodiesterbindungen mit großen Pfeilen angegeben, an welchen das Enzym besonders langsam spaltet. Sie entsprechen den starken Banden in A und B. Die kleineren Pfeile gehören zu weniger ausgeprägten Banden und die offenen Pfeile zeigen Bindungen an, die besonders rasch gespalten werden. Das ist am Fehlen der entsprechenden Bande im Sequenzgel zu erkennen. Die Balken unter den Nukleotiden in der Mitte der Sequenz geben die Position des Endmusters der Exonukleaseverdauung an (siehe A und B).

Deutlich wird, daß das Enzym zwischen den abzuspaltenen Nukleotiden unterscheidet, wobei das benachbarte Nukleotid nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. So findet sich G bei den sehr langsam abgespaltenen Nukleotiden mit Abstand am häufigsten, während das gleiche für C bei den sehr rasch abgespaltenen Nukleotiden gilt. Verlangsamte oder stark verlangsamte Spaltung wurde bei etwa der Hälfte aller G-Nukleotide gefunden, bzw. es wurden 36% aller C-Nukleotide überdurchschnittlich leicht abgespalten. A und T ließen sich nicht eindeutig zuordnen, sie werden größtenteils mit mittlerer Geschwindigkeit abgespalten und zeigen eine größere Abhängigkeit vom Nachbarnukleotid. Diese Daten basieren auf dem Abschätzen der Intensität der Banden im Autoradiogramm. Die Stärke der Bande ist allerdings nicht nur eine Funktion der Abspaltbarkeit durch die Exonuklease, sondern hängt auch von der Spaltungsgeschwindigkeit der vorhergehenden Bindungen der Sequenz ab. Gesicherte quantitative Daten über die Unterschiede zwischen den vier Nukleotiden erforderten deshalb andere Methoden.

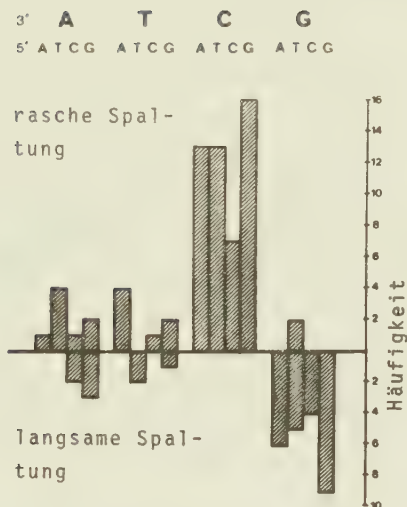


Abb.6 Unterschiedliche Empfindlichkeit der Dinukleotidbindungen gegenüber der Verdauung durch Exonuklease III. Die Daten entstammen der Analyse von 3 pBR322-Fragmenten (Abb.4 und 5) mit der Sequenzgelelektrophorese. Am oberen Bildrand sind die sechzehn Dinukleotide gezeigt, wobei die fettgedruckten Buchstaben den 3'-Nukleotiden entsprechen, die durch die Exonuklease III von den Nukleotiden in 5'-Position (darunter vermerkt) abgespalten werden. Zu den langsam gespaltenen Dinukleotidbindungen wurden nur die kräftigsten Banden im Sequenzgel gezählt (in Abb.5 mit  markiert) während die schnell gespaltenen Bindungen denen in Abb.5 mit  bezeichneten entsprechen. Es ist angegeben, wie oft sie bei den untersuchten Fragmenten gefunden wurden. Die Banden der Endmuster wurden nicht berücksichtigt.

2.1.3. Quantitative Analyse der Exonukleaseverdauung von synthetischen DNA-Substraten

Zur quantitativen Analyse der Exonukleaseverdauung bot sich die Verwendung von synthetischer DNA an, die üblicherweise in der Molekularbiologie benutzt wird, um an DNA-Fragmente neue Restriktionsstellen anzuheften. Durch ihre palindromische Struktur hat sie den Vorteil, von beiden 5'-Enden aus die gleiche Sequenz zu besitzen. Damit entfällt die Notwendigkeit, DNA, die nur an einem der beiden 5'-Enden markiert ist, benutzen zu müssen, stattdessen kann die leicht zugängliche doppelmarkierte DNA verwendet werden. Durch Selbstligierung der HindIII-Linker DNA 5'CAAGCTTG 3' und der EcoRI-Linker DNA 5'GGAATTC 3' wurden oligomere DNA-Fragmente erhalten (Abb.7).



Abb.7 Synthese von längeren palindromischen DNA-Fragmenten durch Selbstligierung von synthetischer DNA. Es wurden 5 µg DNA der Sequenz 5'CAAGCTTG 3' (Hind III-Linker) mit (32 P)-ATP phosphoryliert (spezifische Aktivität 500 mCi /mmol) und mit 1 E T_4 -Ligase bei 14° für 2 Std inkubiert. Anschließend wurde die DNA auf einem 8% PAA-Gel aufgetrennt und die oligomeren palindromischen DNAs aus dem Gel gewonnen. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren angegeben.

Zunächst wurde versucht, diese Oligomere mit einem präparativen Sequenzgel zu isolieren. Interessanterweise war es nicht möglich, diese denaturierte DNA wieder zu doppelsträngiger DNA zu renaturieren. Offensichtlich bilden sich dabei durch Rückfaltung sehr stabile Haarnadelstrukturen aus, wie sie bei solchen palindromischen Sequenzen möglich sind. Dies wird auch durch eine analytische nichtdenaturierende Gelelektrophorese bestätigt (Abb.8), in der diese

Strukturen erheblich schneller wandern als die ursprünglichen doppelsträngigen Oligomere, die daneben gezeigt sind. Über nichtdenaturierende Gele konnten dann trimere und tetramere doppelsträngige DNA isoliert und für die Versuche mit Exonuklease III eingesetzt werden.

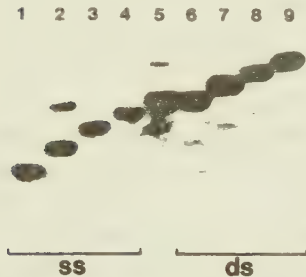


Abb.8 Analyse oligomerer DNA nach Isolierung aus dem Gel. Die DNA-Fragmente wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen einer 6% PAA-Gelelektrophorese unterworfen. Die mono-, di-, tri- und tetramere DNA in Bahn 1-4 (ss) wurden aus einem denaturierenden Sequenzgel isoliert, während die di-, tri-, tetra- und pentamere DNA in Bahn 6-9 (ds) aus einem nicht denaturierenden

Gel stammt (Abb.7). Die pentamere DNA (Bahn 9) wurde auf 100° erhitzt und langsam abgekühlt (Bahn 5).

Kinetisch stellt der exonukleolytische Abbau eines DNA-Fragmentes eine konsekutive Reaktion dar vom Typ $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \dots N$. A entspricht der Ausgangs-DNA, B, C, ..., N sind die Abbauprodukte, die jeweils um ein Nukleotid kürzer sind als das vorhergehende DNA-Fragment (betrachtet wird nur der vom 3'-Ende abgebaute DNA-Einzelstrang). Jedem Schritt, d.h. der Spaltung einer Dinukleotidbindung durch die Exonuklease, kann eine Geschwindigkeitskonstante k_i zugeschrieben werden, die dann ein Maß für die Geschwindigkeit dieser Spaltung ist. Der Verlauf der Verdauung kann durch die Auflösung der entsprechenden Differentialgleichungen, die die Abhängigkeit der Menge an Verdauungsprodukt von der Zeit beschreiben, mathematisch exakt erfaßt werden. Sie verhalten sich analog zu den Differentialgleichungen, welche die Zerfallsreihen einiger radioaktiver Elemente beschreiben, eine gleichfalls konsekutive Reaktion mit vielen Gliedern. Diese Differentialgleichungen wurden 1910 von Bateman (66) in symmetrischer Form aufgelöst : Für den Fall, daß $A(0)=A_0$

und $B_0 = C_0 = \dots N_0 = 0$ ist, wenn also nur Substanz A anfangs vorliegt, lautet die allgemeine Lösung:

$$N(t) = c_1 e^{-k_1 t} + c_2 e^{-k_2 t} + \dots c_n e^{-k_n t}$$

$$C_1 = \frac{k_1 k_2 \dots k_{n-1} A_0}{(k_2 - k_1)(k_3 - k_1) \dots (k_n - k_1)}$$

$$C_2 = \frac{k_1 k_2 \dots k_{n-1} A_0}{(k_1 - k_2)(k_3 - k_2) \dots (k_n - k_2)}$$

usf.

(Die Gleichungen in aufgelöster Form sind in Materialien und Methoden angegeben).

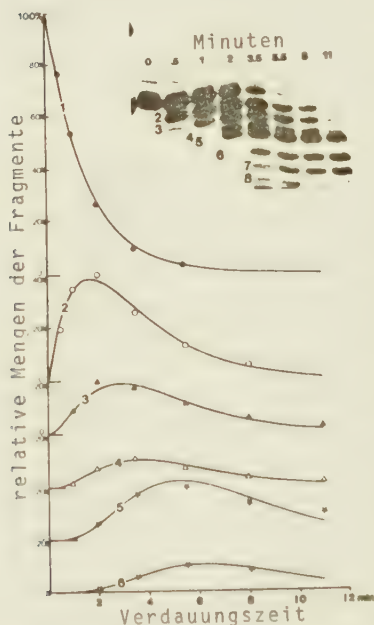


Abb.9 Quantitative Analyse der Verdauung der trimeren HindIII-Linker DNA mit Exonuklease III. Das Trimer (24 bp) der Hind III-Linker DNA wurde mit Exonuklease III verdaut (0,16 E / μ g DNA) und Proben zu den im Bild angegebenen Zeiten entnommen. Diese wurden in einem 18% Sequenzgel analysiert, das 90% Formamid enthielt, um eine vollständige Denaturierung der palindromischen DNA zu erreichen (67); s. Bildeinschub. Die relative Menge eines jeden Fragmentes, das bei der Verdauung neu entstand, wurde bestimmt, indem die Bande ausgeschnitten und die Radioaktivität gemessen wurde. Diese Meßpunkte sind für die ersten 6 Fragmente in Abhängigkeit von der Verdauungszeit aufgetragen (mit Symbolen dargestellt). Die durchgezogenen Kurven wurden mit einem Tischrechner

(Tektronix 4052) und dem Programm von Marquardt (68) erhalten und stellen die Anpassung der theoretischen Gleichungen, denen der exonukleolytische Abbau der DNA gehorcht, an die experimentellen Werte dar.

Diese Voraussetzungen entsprechen der Situation zu Beginn des Exonukleaseabbaus von einem DNA-Fragment. Um nun die Geschwindigkeitskonstanten k_i für jeden Schritt errechnen zu können, wurden zunächst die Zwischenprodukte der Verdauung quantitativ bestimmt. In Abb.9 ist dies für die trimere HindIII-Linker DNA gezeigt. Die sechs ersten exonukleolytischen Abbauprodukte konnten aufgrund ihrer radioaktiven Markierung ausgezählt und die quantitativen Daten in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen werden. Die theoretischen Gleichungen, die diesen Vorgang beschreiben, wurden dann für verschiedene k_i gelöst und mit Hilfe eines Tischrechners und eines Anpassungsprogrammes an die experimentellen Daten angepaßt. Die erhaltenen Geschwindigkeitskonstanten sind in Abb.10 als Maß für die Spaltbarkeit einer Dinukleotidbindung für die EcoRI- als auch die HindIII-Linker DNA zu sehen.

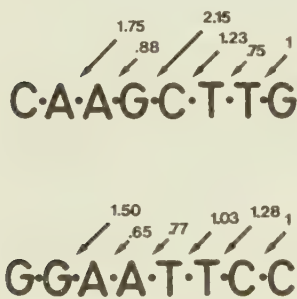


Abb.10 Die relativen Geschwindigkeitskonstanten für die Verdauung der Dinukleotidbindungen durch Exonuklease III in der HindIII-Linker DNA (oben) und der EcoRI-Linker DNA (unten). Alle k -Werte wurden errechnet aus vier unabhängigen Verdauungsexperimenten, und ihr arithmetisches Mittel ist angegeben. Der Wert für k_1 wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte darauf bezogen. Ihre relativen Standardabweichungen variieren von 5% für k_1 (erster Pfeil von rechts) bis zu 15% für k_6 (erster Pfeil von links).

Der k -Wert der ersten Bindung ist auf 1 normiert, und die anderen Werte sind auf diesen bezogen. So erhält man ein relatives Maß, um wieviel besser oder schlechter eine Dinukleotidbindung in bezug auf die anderen gespalten wird. Die Auswertung dieser Daten ergibt eine deutliche Sequenzspezifität der Exonuklease III auf der Ebene des Nukleotides,

das abgespalten wird. Das Nukleotid C wird rasch, G hingegen langsam abgebaut. Das sieht man z.B. deutlich in der Mitte der HindIII-Linker DNA, wo sich die Geschwindigkeit der G- und C-Abspaltung um den Faktor 2,44 unterscheidet. Daß C viel leichter von der Exonuklease abgespalten wird als G, zeigten schon die Daten, welche mit den pBR322-Restriktionsfragmenten erhalten wurden. Ein anderes Bild ergibt sich für das Verhalten des Enzyms gegenüber A und T. Die Messung der relativen Geschwindigkeitskonstanten zeigt, daß in der HindIII-Linker DNA die Dinukleotidbindung AA doppelt so schnell gespalten wird wie die benachbarte TT-Bindung ($k_{AA} : k_{TT} = 2,33$), in der EcoRI-Linker DNA aber nur halb so schnell ($k_{AA} : k_{TT} = 0,63$). Es wird die große Schwankungsbreite deutlich, die im Verhalten der Exonuklease gegenüber A- und T-Nukleotiden besteht, und es zeigt sich auch, daß die Abspaltung hier in größerem Maße von Nachbarsequenzen abhängig ist, als für C und G gefunden wird. Insgesamt wurden die Geschwindigkeitskonstanten von zehn der 16 möglichen Dinukleotiden untersucht und Unterschiede der Spaltbarkeit um etwa den Faktor 3 gefunden. Obwohl das nicht allzuviel erscheint, muß doch bedacht werden, daß sich im Verlaufe einer Verdauung diese Differenzen aufsummieren können, vornehmlich, wenn beide DNA-Stränge eine stark unterschiedliche Basenzusammensetzung zeigen, wie es häufig bei hochrepetitiver DNA gefunden wird (37). So verwundert es nicht, daß in den Experimenten mit Maussatelliten-DNA (siehe Abb.3) die exonukleolytische Verdauung der beiden Stränge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit verläuft (diese DNA besitzt eine ungleiche Verteilung von A und T mit 46% T und nur 18% A im T-reichen Strang und umgekehrt für den A-reichen Strang). Da G und C in beiden DNA-Strängen etwa gleich verteilt sind, dürfte der Unterschied bei der Verdauung der Stränge in der ungleichen Verteilung von A und T zu sehen sein.

2.1.4. Stört die Sequenzspezifität von Exonuklease III die Untersuchungen an DNA-Histonkomplexen?

Es ist denkbar, daß z.B. Anhäufungen von G-Nukleotiden die Exonuklease schon auf proteinfreier DNA stark hemmen und stabile Fragmente entstehen, die mit Fragmenten, welche durch die Bindung eines Proteins vor dem exonukleolytischen Abbau geschützt werden, verwechselt werden können. Jedoch stellt die Bindung der Histone an die DNA im Nukleosom, wie in Experimenten im Abschnitt 2.3 gezeigt wird, eine viel stärkere Barriere für das Enzym dar, als es ein Nukleotid sein kann. Eher ist es möglich, daß die stabilen Fragmente, die am Ende der Verdauung übrigbleiben, wenn sie so ungewöhnlich sind wie bei der Maussatelliten DNA, Grund zu Verwechslungen geben mit Fragmenten, die bei der Analyse eines DNA-Proteinkomplexes entstehen. Es ist daher geboten, als Kontrollversuch bei solchen Analysen in jedem Falle eine Verdauung der freien DNA durchzuführen. Wie im folgenden bei der Bestimmung von Nukleosomenpositionen mit Exonuklease III deutlich wird, ist bei diesem Vorgehen keine Beeinträchtigung der Analyse durch die Sequenzspezifität des Enzyms gegeben.

2.2. Rekonstitution von Mononukleosomen

2.2.1. Charakterisierung von rekonstituierten Nukleosomenkern-Partikeln durch die Nukleoprotein-Gelelektrophorese

Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Kernpartikel des Nukleosoms, in dem genau 145 bp DNA mit dem Histonoktamer, bestehend aus je 2 der Histone H2A, H2B, H3 und H4, assoziiert und $1\frac{3}{4}$ mal um den Histonkern herumgewickelt ist. Das nukleosomale Kernpartikel ist somit die unterste Stufe, auf der man mit der Rekonstitution von Chromatin beginnen kann. Aus diesem Grunde und da die nukleosomale Kern-DNA leicht verfügbar ist, stand am Anfang der Bemühungen, ein Rekonstitutionssystem aufzubauen, die Rekonstitution und Untersuchung dieses Partikels.

Die nukleosomalen Kern-Partikel wurden mit der Salzdialysemethode rekonstituiert. Dabei werden die vier Histone mit der DNA in Gegenwart von 2 M NaCl zusammengemischt und die Ionenstärke über Nacht auf 0 M NaCl erniedrigt. Die Histone stammten aus Hühnererythrozytenkernen und wurden in ihren H2A+H2B und H3+H4-Anteil getrennt (Abb.11C). So war es möglich, den Einfluß der beiden Fraktionen auf das rekonstituierte Material zu testen. Die 145 bp große DNA stammte von nativen Nukleosomenkern-Partikeln, die ebenfalls aus Hühnererythrozyten isoliert worden waren. Die Analyse des rekonstituierten Materials mit der Gelelektrophorese unter nichtdissoziierenden Bedingungen erwies sich als besonders günstig. Diese Methode bietet eine hohe Auflösung im mononukleosomalen Größenbereich und war erfolgreich von anderen Autoren zur Analyse von Nukleosomen und HMG-Nukleosomenkomplexen angewandt worden (69-71). Abb.11A zeigt eine solche Gelanalyse eines nativen und eines rekonstituierten Kern-Partikels (Bahn 2,3) und von löslichem na-



Abb.11 Die Analyse von rekonstituierten nukleosomalen Kernpartikeln mit der Nukleoproteingelelektrophorese.

A. DNA von etwa 145 bp Länge wurde mit den vier Kernhistonen im molaren Verhältnis der Komponenten 1:2:2 (DNA:H2A+H2B :H3+H4, Bahn 2) rekonstituiert. Lösliches Chromatin, das mit *Micrococcus*-Nuklease-verdauung von Hühnererythrozytenkernen erhalten wurde, ist in Bahn 1 gezeigt (die Lage des Mononukleosoms ohne H1/H5 (a), mit H1/H5 (b) und des Dinukleosoms (c) ist angegeben). Das native nukleosomale Kernpartikel ist in Bahn 3 gezeigt.

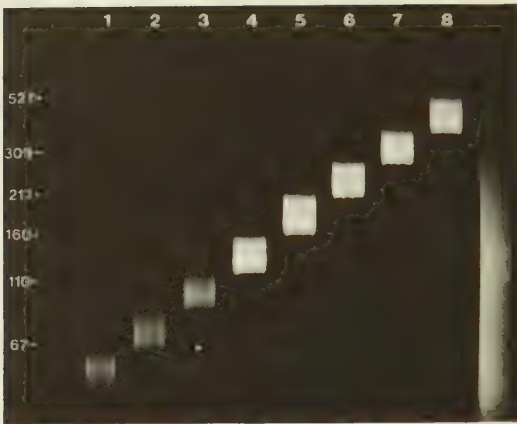
B. Die Bahnen 1-3 zeigen die Rekonstitution von 145 bp DNA mit den Histonen H3+H4 in den molaren Verhältnissen 1:2, 1:3 und 1:4 (DNA : H3+H4) und die Bahnen 4-6 die gleichen Experimente mit H2A+H2B. In Bahn 7 ist die Rekonstitution von nukleosomalen Kernpartikeln mit allen vier Histonen (wie in A beschrieben) zum Vergleich gezeigt.

C. SDS-Gelelektrophorese der in A und B verwendeten Histonfraktionen. Die Bahnen 1-5 zeigen nacheinander H1, H2A+H2B, alle vier Nukleosomenkernhistone, H3+H4 und H2A+H2B.

tivem Chromatin (Bahn 1), wie es durch Micrococcus-Nukleaseabbau von Kernen aus Hühnererythrozyten erhalten wird. Weiterhin wurden Rekonstitutionsexperimente mit den Histonfraktionen H2A+H2B und H3+H4 durchgeführt (Abb.11B). Mit einem Gemisch beider Fraktionen bildet sich ein Partikel, das elektrophoretisch mit dem nativen Nukleosomenkern-Partikel identisch ist (Abb.11B, Bahn 7 und Abb. 11A, Bahn 2,3). Interessanterweise entsteht bei der Rekonstitution mit H3+H4 alleine ein Partikel, das in der Elektrophorese etwas schneller wandert als ein Kern-Partikel (Abb.11B, Bahn 1-3). Wird die Konzentration von H3+H4 erhöht, erscheint ein weiteres Partikel auf gleicher Höhe wie das Kernpartikel. Bei der Rekonstitution mit der Histonfraktion H2A+H2B entstehen diese Partikel nicht, sondern es bilden sich mit der 145 bp DNA Assoziate, die in der Elektrophorese aber keine deutlichen Banden, sondern eine breite Verteilung zeigen. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Simon et al. (72) und Stockley und Thomas (73), die gefunden haben, daß die Histone H3+H4 mit der 145 bp DNA eine Struktur bilden, die in ihren hydrodynamischen Eigenschaften dem Nukleosomenkern sehr ähnlich ist, während mit H2A+H2B keine definierten Strukturen gebildet werden. Eine Analyse von rekonstituiertem Material im Nukleoproteingel liefert also auf einfache Weise zuverlässige Information über seine Zusammensetzung und ist geeignet, neben der herkömmlichen Rohrzuckergradientenzentrifugation für die Charakterisierung von rekonstituiertem Material eingesetzt zu werden. Dieses Gelsystem wird in den folgenden Experimenten durchgehend zu diesem Zwecke verwendet.

2.2.2. Die Rekonstitution von Nukleosomen ist abhängig von der Größe und Sequenz der DNA

Bislang liegen über die Rekonstitution kurzer DNA-Fragmente Ergebnisse von Tatchell und Van Holde (55) vor, die zeigen, daß bis zu einer Größe von 161 bp die Position der Nukleosomen von den Enden des DNA-Fragmentes bestimmt wird. Um den Einfluß der DNA-Länge über 161 bp bis zu einer Fragmentlänge von wenigstens 260 bp (ab dieser Größe können sich Dinukleosomen bilden) auf die Rekonstitution von Mononukleosomen zu untersuchen, wurden DNA-Fractionen definierter Größe präpariert. Hochmolekulare Kalbsthymus-DNA wurde mit Micrococcus-Nuklease verdaut und dieses Gemisch doppelsträngiger Fragmente einer präparativen Gelelektrophorese unterworfen. Aus dem in Streifen geschnittenen Gel konnten eine Reihe von DNA-Fractionen definierter Größe isoliert werden (Abb.12). Auf diese Weise gewonnene DNA-Fractionen von 90-300 bp Länge wurden mit einem äquimolaren Gemisch aller vier Kernhistone rekonstituiert wie in Abb.13 gezeigt ist. Es findet sich das rekonstituierte Material in der Gelanalyse im Bereich von Mono- und Dinukleosom, während die schneller wandernde freie DNA im unteren Gelabschnitt läuft. Allerdings verändern schon relativ geringe Schwankungen in der Histon-Stöchiometrie und dem Verhältnis DNA/Histone die Zusammensetzung des rekonstituierten Materials so, daß keine eindeutigen Effekte, die der Länge der DNA zuzuschreiben wären, zu erfassen waren. Diese Schwierigkeiten konnten durch eine Modifizierung des üblichen Verfahrens überwunden werden. Dazu wird radioaktiv markierte DNA in geringer Menge und native Mononukleosomen, welche das Histon H1 nicht mehr enthalten, gemischt und der Salzdialysemethode unterworfen. Die Mononukleosomen dienen einerseits als Histonquelle für die zugesetzte markierte DNA, wobei immer ein physiologisches DNA : Histonverhältnis vorliegt, da die markierte DNA lediglich 1-2% der unmarkier-



100, 135, 190, 250, 335 und 440 bp (Bahnen 1-8). Die Abbildung zeigt ein 5% PAA-Gel, angefärbt mit Ethidiumbromid (1 µg/ml).

Abb.12 Die Isolierung verschiedener DNA-Größenklassen aus Kalbsthymus DNA. Kalbsthymus DNA wurde mit Micrococcus-Nuklease verdaut (im Gel rechte Bahn). Die abgebaute DNA wurde dann durch präparative PAA-Gelelektrophorese und Ausschneiden der Gelstreifen in verschiedene Größenklassen fraktioniert. Die durchschnittlichen Längen sind 55, 70,



Abb.13 Die Rekonstitution von Kalbsthymus DNA-Fractionen verschiedener Größe mit freien Histonen.

DNA-Fractionen der durchschnittlichen Größe 90, 120, 150, 190, 230, 280, 330 bp (Bahn 1-7) wurden mit freien Histonen aus Hühnererythrozyten (1:2:2 DNA: H2A+H2B: H3+H4) rekonstituiert und im 4% Nukleoproteingel analysiert.

Rekonstituiertes Material ist oberhalb der Längenreferenzbande von 309 bp Länge zu erkennen, darunter sieht man die freie DNA. Das Gel ist mit Ethidiumbromid angefärbt.

ten DNA ausmacht. Andererseits ist auch das richtige Verhältnis der Histone untereinander gewahrt. Mit dieser Art von Rekonstitution ist es nun einfach, die Affinität verschiedener DNA-Fragmente zum Histonoktamer miteinander zu vergleichen, da eine geringe Menge dieser markierten DNA zugesetzt zu einem 50-100 fachen Überschuß an Mononukleosomen in der Rekonstitution praktisch mit stets der gleichen Menge an mononukleosomaler DNA um die Histone konkurriert.

Sechs DNA-Fractionen im Größenbereich von 150-300 bp, präpariert aus Kalbsthymus DNA nach der oben beschriebenen Methode, wurden am 5'-Ende radioaktiv markiert, zu H1-freien Mononukleosomen zugemischt und einer Rekonstitution mit der Salzodialysemethode unterworfen. Das rekonstituierte Material wurde in der Gelelektrophorese bei niedriger Ionenstärke analysiert (s. Abb.14). Freie DNA sieht man im unteren Teil des Geles, während die rekonstituierten Partikel eine reduzierte Mobilität zeigen und daher im oberen Teil zu finden sind. Bei den 150-200 bp langen DNA-Fragmenten bleibt nach der Rekonstitution neben dem rekonstituierten Material noch freie DNA übrig, während bei den Fragmenten über 200 bp keine freie DNA mehr zu finden ist. Gleichzeitig spaltet sich das rekonstituierte Material in drei Banden auf (Partikel M1, M2 und M3), deren Mengenverhältnis sich mit wachsender Länge der DNA zum Partikel M3 verschiebt, bis schließlich mit der längsten DNA (300 bp) nur noch M3 zu sehen ist (Abb.14). Das Verschwinden der größeren DNA zeigt, daß die Histone bevorzugt an die größere DNA binden und dann drei verschiedene Partikel ausbilden können. Ein weiteres Experiment mit Restriktionsfragmenten zeigt gleichfalls, daß die Affinität der DNA zu den Histonen mit der Größe wächst. In Abb.15 ist die Rekonstitution der 26 HpaII-Fragmente von pBR322 DNA zu sehen. Man erkennt auf dem Autoradiogramm, daß nach Rekonstitution die großen Fragmente verschwunden sind und als rekonstituiertes Mate-

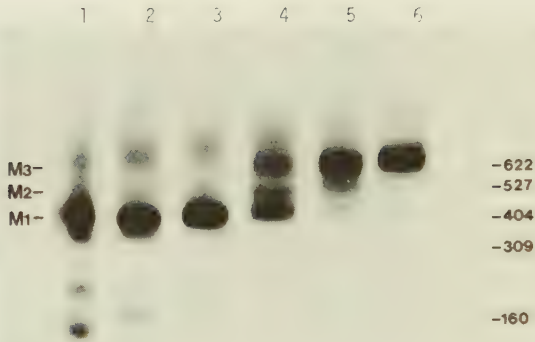


Abb.14 Die Rekonstitution von DNA-Fractionen verschiedener Größe mit Mononukleosomen als Histonquelle. DNA-Fractionen unterschiedlicher Größe aus Kalbsthymus wurden am 5'-Ende markiert, rekonstituiert und in einem 4% Nukleoproteingel analysiert. H1-freie Mononukleosomen der Maus dienten bei der Rekonstitution als Histonquelle. Die durchschnittlichen DNA-Längen sind 150, 175, 205, 250, 275 und 300 bp (Bahn 1-6). Die Größenangaben im Gel beziehen sich auf doppelsträngige DNA und sind in Basenpaaren angegeben. Die rekonstituierten Partikel sind mit M1, M2 und M3 bezeichnet.

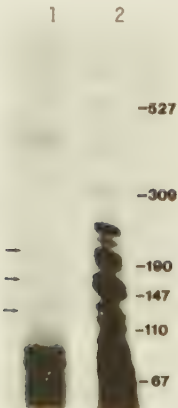


Abb.15 Die Rekonstitution eines Fragemengemisches von pBR322 DNA. pBR322 DNA wurde mit HpaII verdaut, die Fragmente am 5'-Ende mit ^{32}P markiert und mit Mausmononukleosomen als Histonquelle rekonstituiert. Die Abbildung zeigt ein Nukleoproteingel mit der DNA nach der Rekonstitution (Bahn 1) und davor (Bahn 2).

rial im oberen Teil des Geles wandern, während die kurzen Fragmente eine geringere Affinität zu den Histonen zeigen.

Die Rekonstitution wird aber nicht nur von der Größe der DNA beeinflusst, sondern sie ist auch von der Sequenz abhängig. Vergleicht man die DNA in Abb.15 vor und nach der Rekonstitution, ist zu erkennen, daß einige Fragmente nach Rekonstitution stärker reduziert sind als andere von ähnlicher Größe (markiert mit einem Pfeil). Diese Unterschiede in der Affinität zu den Histonen kann nicht mehr von der Größe abhängen, sondern muß der Sequenz der DNA-Fragmente zugeschrieben werden.

2.2.3. Analyse der rekonstituierten Partikel M1, M2 mit Exonuklease III

Um festzustellen, ob in rekonstituierten Partikeln stets ein Histonoktamer an die DNA gebunden ist und um die Position dieses Histonoktamers auf der DNA zu bestimmen, wurde Exonuklease III aus E.coli verwendet. Abb.16 zeigt die Strategie dieser Experimente, für die stets DNA verwendet wurde, die am 5'-Ende radioaktiv markiert war. Exonuklease III baut bei doppelsträngiger DNA jeden Strang von seinem 3'-Ende her ab. Durch die Bindung von Protein, z.B. von Histonen, an die DNA wird diese vor dem Abbau geschützt und der exonukleolytische Abbau geht nur bis zum Rande der Proteinbindung. Im Falle des Nukleosoms bleiben 145 bp doppelsträngige DNA und am 5'-Ende überhängende einzelsträngige DNA übrig (Abb.16A). Durch Längenmessung der verbleibenden DNA-Stränge mit der Sequenzgelelektrophorese ist die Position eines gebundenen Histonoktamers bestimmbar. Aus dem Muster dieser Fragmente ist direkt zu sehen, ob sich das Histonoktamer etwa am Ende des DNA-Fragmentes befindet (Abb.16B, 2. Beispiel), in der Mitte (Abb.16B, 3. Beispiel, eine von vielen möglichen Positionen ist gezeigt) oder ob die ganze DNA von Histonprotein geschützt ist (Abb.16B, 4. Beispiel). Die zu einer Position gehörenden zwei Banden

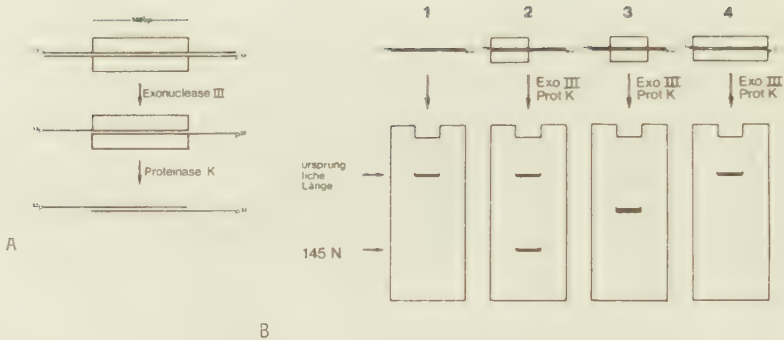


Abb.16 Die Bestimmung der Nukleosomenpositionen mit Exonuklease III.
A. Bei der Verdauung eines Mononukleosoms mit Exonuklease III schützt das Histonektamer die nukleosomale DNA vor dem Abbau am 3'-Ende. Nach dem Entfernen der Histone mit Proteinase K kann die DNA im Sequenzgel analysiert werden (s. B). Die DNA liegt an den 5'-Enden radioaktiv markiert vor.
B. Die Positionen des Histonektamers geben nach Exonukleaseverdauung charakteristische Muster im Sequenzgel. Bahn 1 zeigt die DNA vor der Rekonstitution. In Bahn 2 ist das Histonektamer mit den terminalen 145 bp der DNA assoziiert. Daraus resultieren zwei Fragmente, eines mit der Anfangslänge und das zweite mit 145 bp Länge nach Verdauung mit Exonuklease III. Bahn 3 zeigt eine interne Position des Histonektamers, die zwei gleich große Fragmente ergibt und in Bahn 4 ist die DNA auf ihrer ganzen Länge an Histone gebunden und gegen Abbau vollständig geschützt.

ergeben dabei immer die Ausgangsgröße der eingesetzten DNA plus 145 bp. Größere Werte zeigen an, daß mehr als ein Histonektamer die DNA bedeckt, während geringere Werte bedeuten, daß der Exonukleaseabbau bereits über den regulären Halt in die proteinbedeckte Region hineingegangen ist.

Für die Analyse der rekonstituierten Partikel M1-M3 wurde die 250 bp lange DNA-Fraktion gewählt, da bei deren Rekonstitution die drei Partikel in etwa gleicher Menge vorliegen (s. Abb.14). Diese konnten durch präparative Gelelektrophorese einzeln isoliert werden und waren weitgehend stabil wie ihre Reelektrophorese in Abb.17A zeigt. Die Charakterisierung dieser Partikel erfolgte nach dem Schema in

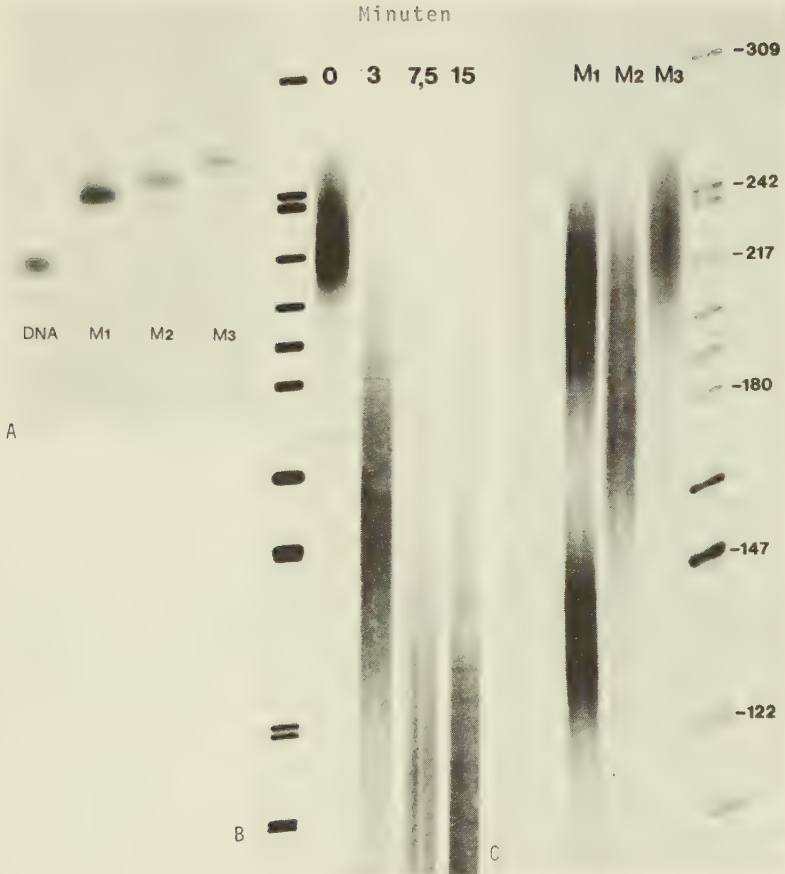


Abb.17 Isolierung und Charakterisierung der Partikel M1, M2 und M3.

A. Die 250 bp DNA-Fraktion aus Kalbsthymus wurde am 5'-Ende radioaktiv markiert, rekonstituiert (Abb.14, Bahn 4), die Partikel M1, M2 und M3 aus dem Nukleoproteingel gewonnen und unter gleichen Bedingungen reelektrophoretisiert.

B. Die 250 bp DNA-Fraktion wurde vor der Rekonstitution am 5'-Ende markiert und mit Exonuklease III (0.4 E/ μ g DNA) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Das Autoradiogramm einer 6% Sequenzgelelektrophorese ist gezeigt.

C. Die rekonstituierten Partikel wurden 15 Min lang mit Exonuklease III (0.4 E/ μ g DNA) inkubiert und analysiert wie die DNA in B.

Abb.16, wonach die Partikel mit Exonuklease verdaut, danach die DNA isoliert und ihre Größe auf dem Sequenzgel analysiert wurde (Abb. 17C). Es ergibt sich folgendes Bild: von Partikel M1 leiten sich zwei DNA-Fragmentklassen ab, eine etwas kleiner als die Ausgangs-DNA, die andere etwa 145 bp lang. Die DNA-Fragmente von M2 hingegen zeigen eine kontinuierliche Verteilung zwischen 145 bp und der ursprünglichen Länge, während die DNA von M3 schließlich so groß bleibt wie vor der Exonukleaseverdauung. Diese Resultate können folgendermaßen interpretiert werden: sowohl M1 als auch M2 stellen Mononukleosomen mit einem Histonoktamer dar, das sich im Falle von M1 am Rande des DNA-Fragmentes befindet, während M2 eine Population vieler interner Positionen repräsentiert. Lediglich die DNA von M3 wurde von Exonuklease III nicht angegriffen. Es muß also angenommen werden, daß die DNA vollständig mit Histon bedeckt und damit geschützt ist. Um diese Folgerungen zu untermauern, und um sicherzugehen, daß vor allem Partikel M2 ein Komplex der DNA mit nicht mehr als einem Histonoktamer ist, das definitionsgemäß 145 bp der DNA bedeckt, wurden die Partikel einer Exonuklease III / Nuklease S1-Verdauung unterzogen. Dazu wird nach dem Exonukleaseabbau deproteinisiert und anschließend die einzelsträngige DNA mit der einzelstrangspezifischen Nuklease S1 abgebaut. Dann gibt die übriggebliebene doppelsträngige DNA direkt die Region der Proteinbedeckung an, die im Falle des Histonoktamers eine Länge von 145 bp haben sollte. Bei diesem Experiment ginge allerdings eine 5'-Endmarkierung bei der Nuklease S1-Verdauung verloren, weswegen vor der Rekonstitution die DNA durch Nicktranslation intern markiert wurde. Die Analyse der nach Nuklease S1 übriggebliebenen doppelsträngigen DNA erfolgte mit nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Das Ergebnis für die 250 bp lange DNA-Fraktion zeigt das Autoradiogramm in Abb.18. Wie erwartet ergeben M1 und M2 ein doppelsträngiges DNA-Fragment von 145 bp Länge. Geringe Überverdauung

der Partikel in diesem Falle mit Exonuklease zeigt die charakteristischen Abbaubanden im 10 bp Abstand. Im Gegensatz dazu zeigt Partikel M3 wiederum keinen Abbau und zeigt damit einen vollständigen Proteinschutz der DNA auf ganzer Länge an.

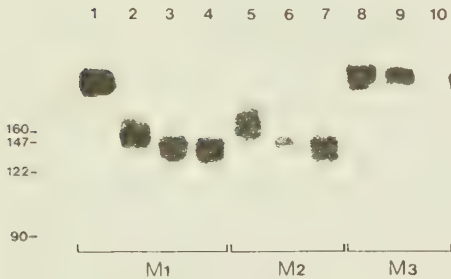


Abb.18 Die Analyse der Partikel M1, M2 und M3 mit Exonuklease III und Nuklease S1-Verdauung. Die 250 bp DNA-Fraktion wurde nicktranslatiert und rekonstituiert. Die Partikel wurden isoliert und mit Exonuklease III verdaut. Nach der Be-

handlung mit Proteinase K wurde die DNA mit Nuklease S1 inkubiert und auf einem 5% PAA-Gel analysiert. Die Exonukleaseverdauung (0.4 E/ μ g DNA) erfolgte für die Dauer von 0 Min (Bahn 1), 4 Min (Bahn 2, 5, 8), 8 Min (Bahn 3, 6, 9) und 12 Min (Bahn 4, 7, 10).

2.3. Die Bestimmung der Nukleosomenpositionen, die in vitro auf Maussatelliten DNA erhalten werden

2.3.1. Rekonstitution von monomerer Maussatelliten DNA mit Histonen und Isolierung der mononukleosomalen Partikel

Auf der Grundlage der Ergebnisse mit nicht sequenzeinheitlicher DNA sollte nun das 234 bp große monomere Fragment der Maussatelliten DNA zu Mononukleosomen rekonstituiert und die Positionen des Histonoktamers in vitro bestimmt werden. Zunächst mußte festgestellt werden, ob auch diese definierte DNA Partikel M1, M2 und M3 bildet. Das Satelliten DNA-Fragment wurde ebenso wie die DNA-Fractionen aus Kalbsthymus als 5'-endmarkierte DNA in Gegenwart von 2 M NaCl unmarkierten Mononukleosomen zugemischt und mit der Salzodialysemethode zum Chromatin rekonstituiert. Abb.19 zeigt das rekonstituierte Material nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Wie mit der 250 bp DNA-Fraktion aus Kalbsthymus haben sich drei Partikel M1, M2 und M3 gebildet. Diese Partikel wurden einer Exonukleaseverdauung unterworfen und die Größe der geschützten DNA-Fragmente im Sequenzgel analysiert (Abb.19B). Partikel M1 zeigt Exonukleasefragmente mit einer Länge von etwa 145 Nukleotiden und das Ausgangsfragment, wie es für eine Endposition des Histonoktamers zu erwarten ist. Die Fragmente, welche 10 und 20 Nukleotide kleiner sind, rühren von einer partiellen Überverdauung vom äußeren Rand her (s. Diskussion). Die Analyse von Partikel M2 ergibt keine kontinuierliche Fragmentverteilung, wie sie für die 250 bp Fraktion der Kalbsthymus DNA gefunden wurde (Abb.17B), sondern eine Serie diskreter Fragmente im Abstand von 5-15 Nukleotiden, die zwischen 145 und 234 Nukleotide groß sind. Die Fragmente sind auch nach verlängerter Inkubation mit Exonuklease III

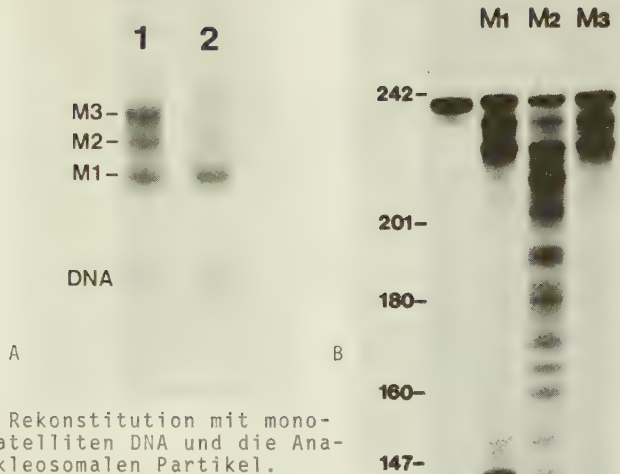


Abb.19 Die Rekonstitution mit monomerer Maussatelliten DNA und die Analyse der nukleosomalen Partikel. A. Monomere Satelliten DNA (EcoRII) wurde rekonstituiert und im 4% Nukleo-
proteingel aufgetrennt (Bahn 1). In Bahn 2 ist als Vergleich das rekonstituierte Material der 250 bp DNA-Fraktion aus Kalbsthymus zu sehen (s. auch Abb.14, Bahn 4).

B. Die Partikel M1, M2 und M3 aus A wurden einzeln isoliert und einer 4 minütigen Exonukleaseverdauung (1,2 E/ μ g DNA) unterworfen. Es ist die Analyse dieser Verdauung auf einem 6% Sequenzgel gezeigt. Links ist die DNA vor der Verdauung zu sehen. Die Einzelstrangenden des EcoRII Monomers waren vor der Rekonstitution zum Doppelstrang aufgefüllt worden (s. auch Abb.21).

stabil und sind nicht mit den diskreten Fragmenten identisch, die bei der Verdauung der freien DNA entstehen (s. auch Abb.22). Dies alles spricht dafür, daß diese stabilen Fragmente die Folge der Bindung von Histonoktameren in definierten Positionen sind und entsprechend jeweils ein Paar spezifischer Fragmente vor dem weiteren Abbau geschützt werden. Partikel M3 schließlich scheint, abgesehen von einer geringen Überverdauung vom Ende her, gegenüber der Exonuklease resistent zu sein. Weitere Fragmente, wie sie für Partikel M1 und M2 charakteristisch sind, fehlen bei M3.

Das bedeutet, daß M3 auf der ganzen DNA-Länge geschützt ist, wie es auch bei der Rekonstitution mit den Kalbsthymus DNA-Fraktionen deutlich wurde und durch die Bindung überschüssiger Histone erklärt werden kann.

Um sicherzustellen, daß die bei der Analyse von Partikel M2 erhaltenen diskreten Fragmente durch den Schutz eines Histonoktamers entstehen, wurden alternative Möglichkeiten überprüft. Wie in Abb.20A gezeigt ist, können bei einer intensiven Überverdauung mit Exonuklease III ähnliche Fragmente entstehen wie sie für Partikel M2 gefunden werden (Schema b). Auch eine zusätzliche Bindung von Histon kann Anlaß zu Fragmenten geben, die mit den in Abb.20B gefundenen zu verwechseln sind (Schema c). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde nach der Exonukleasebehandlung eine Nuklease S1-Verdauung angeschlossen. Danach bliebe eine doppelsträngige DNA übrig, die entweder größer (Schema c) oder kleiner (Schema b, Abb.20A) als 145 bp ist, wenn die alternativen Erklärungen zutreffen sollten. Abb.20B zeigt, daß tatsächlich etwa 145 bp DNA geschützt sind und deshalb Partikel M2 auch im Falle der Maussatelliten DNA eine Population von Histonoktameren mit definierten Positionen darstellt.

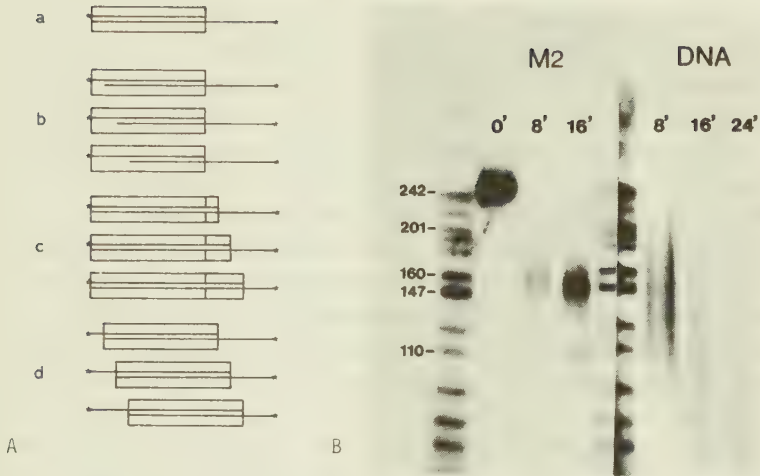


Abb.20 Analyse der rekonstituierten Partikel mit Exonuklease III und Nuklease S1.
A. Das Schema zeigt, daß Partikel M1 (a) ein ähnliches Abbaumuster geben kann wie Partikel M2 (d), wenn entweder überverdaut wird (b) oder zusätzliche Histone gebunden sind (c). Man beachte, daß in (b) und (c) der Bereich der doppelsträngigen DNA, der nach Exonukleaseverdauung übrigbleibt, nicht mehr 145 bp umfaßt.
B. Monomere Satelliten DNA (EcoRII) wurde nicktranslatiert, rekonstituiert und Partikel M2 isoliert. Nach dem Abbau mit Exonuklease III (0,4 E/ μ g DNA) für die in der Abbildung angegebenen Zeiten wurde das Material deproteinisiert, mit Nuklease S1 verdaut und die übriggebliebene doppelsträngige DNA in einem 5% PAA-Gel analysiert (links). Gleichermäßen behandelte freie DNA ist rechts gezeigt.

2.3.2. Die Analyse von drei rekonstituierten Monomeren der Satelliten DNA zeigt, daß die internen Nukleosomenpositionen nur von der DNA-Sequenz bestimmt werden

Der Abstand von ungefähr 10 bp zwischen den verschiedenen Nukleosomenpositionen der Satelliten DNA könnte bedeuten, daß die Histone vom Ende der DNA in vielfachem Abstand einer helikalen DNA-Windung binden, unabhängig von der DNA-Sequenz. Wäre das der Fall, so könnten Auswirkungen der DNA-Sequenz auf die Position des Histonoktamers nicht analysiert werden. Die spezielle Situation von zwei überlappenden Restriktionsstellen auf der Maussatelliten DNA für die Enzyme Sau96 und EcoRII eröffnet nun einen direkten Weg, den möglichen Einfluß der DNA Enden, an denen sich die Histonoktamere im 10 bp Abstand orientieren könnten, auf die internen Nukleosomenpositionen in Partikel M2 auszuschließen. Hochmolekulare Satelliten DNA wurde jeweils mit Sau96, EcoRII oder BstNI (einem Isoschizomer von EcoRII) verdaut und nach Auffüllen der überstehenden Enden drei Satelliten-Monomere von fast der gleichen Länge erhalten, die lediglich an etwas unterschiedlichen Stellen in der Repetitionseinheit anfangen und enden (Abb.21).

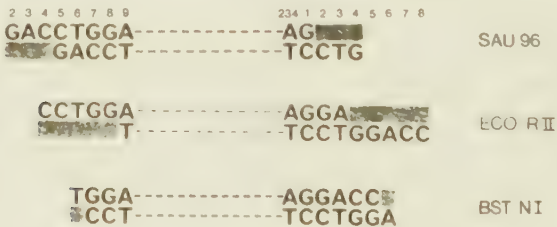


Abb.21 Drei verschiedene Monomere können mit den angegebenen Nukleasen aus hochmolekularer Maussatelliten DNA präpariert werden. Die zurückgezogenen 3'-Enden der DNAs wurden zum Doppelstrang aufgefüllt (schattierter Bereich). Daraus ergeben sich DNA-Größen von 237 bp (Sau96-Monomer), 239 bp (EcoRII-Monomer) und 235 bp (BstNI-Monomer).

Werden auch die internen Nukleosomenpositionen von den DNA-Enden bestimmt, sind für alle drei endmarkierten Monomere identische Muster nach der Exonukleasebehandlung zu erwarten. Ist aber die Sequenz ausschlaggebend, sollten sich die Exonukleasefragmente alle um dieselben Beträge unterscheiden, wie die dazugehörigen monomeren DNA-Sequenzen es tun. Abb.22B zeigt das Endmuster der drei rekonstituierten Satelliten-Monomere, wie es nach Exonukleaseverdauung von Partikel M2 in Abhängigkeit von der Zeit erhalten wird und exemplarisch für das Sau96 Monomer in Abb.22A gezeigt ist. Diese Muster unterscheiden sich genau in der Weise, wie es bei einer sequenzabhängigen Bindung der Histone ohne Einfluß eines Endeffektes zu erwarten ist. Das wird besonders deutlich, wenn man das Muster für das EcoRII und BstNI Monomer vergleicht (Abb.22B, Bahn 2 und 3). Jedes Fragment, das vom EcoRII Monomer stammt, findet sich auch im BstNI Muster, nur jeweils um 2 Nukleotide kürzer. Das läßt sich zwanglos aus der Tatsache herleiten, daß das BstNI Monomer an beiden DNA-Enden um 2 bp kürzer ist als das EcoRII Monomer (Abb.21). Exonukleasefragmente, die von Histonoktameren stammen, welche bei beiden Satelliten-Monomeren an genau dieselbe DNA-Sequenz binden, müssen deshalb im Falle des BstNI Monomeren um 2 bp kürzer sein als beim EcoRII Monomeren. Für das Sau96 Monomer ist dies anders, da diese DNA am linken Ende um 2 bp länger, am rechten Ende aber um 4 bp kürzer ist, als das EcoRII Monomer (Abb.21). Entsprechend sollten sich die homologen Exonukleasefragmente, die von Nukleosomenpositionen an der gleichen DNA-Sequenz stammen, verhalten, also entweder um 2 Nukleotide länger oder um 4 Nukleotide kürzer sein, verglichen mit dem EcoRII Monomer. Diese Verschiebung der Banden eröffnet die Möglichkeit, indirekt zu bestimmen, welches Fragment die linke oder die rechte Grenze der Nukleosomenposition repräsentiert. Damit konnte eine erste Kartierung der Positionen vorgenommen werden, die dann mit Rekonstitutionsexperimen-

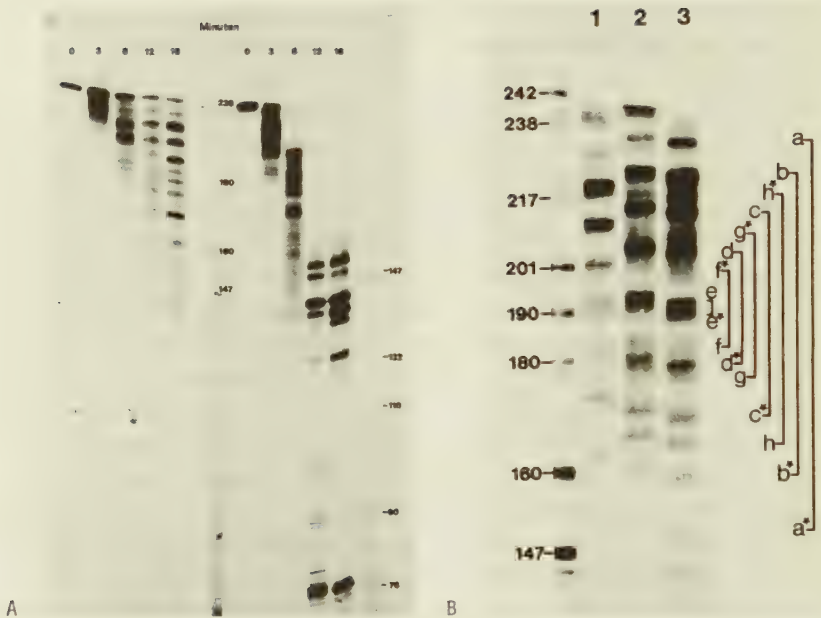


Abb.22 Die Positionen des Histonoktamers im Partikel M2 werden nicht durch DNA-Endeffekte bestimmt.
A. Der Zeitverlauf der Exonukleaseverdauung von Partikel M2 und freier DNA des Maussatellitenmonomeren.
Monomere Satelliten DNA wurde mit Sau96 isoliert, am 5'-Ende markiert und Partikel M2 nach der Rekonstitution mit Exonuklease III (0,3 E/ μ g DNA) verdaut (links). Rechts ist als Kontrolle die Abbaukinetik der freien DNA unter denselben Bedingungen gezeigt. Die Analyse erfolgte mit einem 8% Sequenzgel, die Verdauungszeiten sind im Bild angegeben.
B. Die Exonukleaseanalyse von drei rekonstituierten monomeren Satelliten DNAs.
Die drei monomeren Satelliten DNAs in Abb.21 wurden rekonstituiert, die Partikel M2 isoliert und 12 Min lang mit Exonuklease III (0,6 E/ μ g DNA) verdaut. Die Analyse im 6% Sequenzgel zeigt die Muster der Sau96, EcoRII und BstNI-Monomere (Bahn 1, 2, und 3). Rechts sind die zu einer Nukleosomenposition gehörenden beiden Banden für 8 Positionen kenntlich gemacht (bezieht sich nur auf Bahn 3). Fragmente vom A-reichen Strang der Satelliten DNA sind mit einem Stern gekennzeichnet (s. auch Abb.24).

ten bestätigt werden, zu denen selektiv an einem Ende markierte Monomere benutzt wurden und die im folgenden Kapitel beschrieben sind.

2.3.3. Die eindeutige Bestimmung der Nukleosomenpositionen durch die selektive Markierung der Satelliten DNA an einem Ende

Mit einer DNA, die nur an einem Ende markiert ist, erhält man mit der Exonuklease III-Analyse für jede Histonoktamerposition ein eindeutiges DNA-Fragment. Da die radioaktive Markierung eines DNA-Fragmentes zunächst immer an beiden Strängen erfolgt, wird üblicherweise ein markiertes Ende mit einer geeigneten Restriktionsnuklease abgespalten. Die Präparation einer auf diese Weise an einem Ende markierten monomeren Satelliten DNA stößt allerdings auf Schwierigkeiten, da die einzige zu diesem Zwecke verfügbare zweite Restriktionsstelle bei der Präparation der monomeren DNA aus der hochmolekularen Satelliten DNA zerstört wird. Der Grund ist die Überlappung der beiden Restriktionsstellen für Eco RII und Sau96. Dieses Problem konnte aber überwunden werden durch das Auffüllen der einzelsträngigen Enden, die nach der Spaltung mit der ersten Nuklease entstehen. Dadurch wird die zweite Spaltstelle wieder voll hergestellt und kann zur selektiven Abspaltung von einem markierten Ende dienen. So konnten monomere DNA-Fragmente, die nur am "linken" oder nur am "rechten" Ende markiert waren, isoliert werden (Abb.23). Die Analyse dieser rekonstituierten Satelliten-Monomere mit der Exonukleaseverdauung ist in Abb.24 gezeigt, wo die an einem Ende markierten Monomere mit den doppelmarkierten Monomeren verglichen werden. Auf diese Weise kann jede Bande dem A-reichen oder dem T-reichen Strang zugeordnet werden, was der "linken" oder "rechten" Grenze einer Nukleosomenposition entspricht. Zum Beispiel



Abb.23 Zwei Satellitenmonomere, die nur an einem 5'-Ende markiert sind.
 Das an beiden 5'-Enden markierte Satellitenmonomer (Sau96) wurde mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, mit BstNI nachgespalten und die Enden wieder aufgefüllt. In gleicher Weise wurde mit dem Monomeren (EcoRII) verfahren, das mit Sau96 nachgespalten wurde.

gibt es in Abb.24 A, Bahn 1 (beide Enden sind markiert) zwei Fragmente etwas kleiner als 145 Nukleotide, eines 144, das andere 141 Nukleotide lang, während in Bahn 2 (nur der T-reiche Strang ist markiert) nur noch das Fragment mit 141 Nukleotiden erscheint. Dieses Fragment repräsentiert somit die linke Grenze der Nukleosomenposition auf dem T-reichen Strang, während das übriggebliebene Fragment die rechte Grenze des Nukleosoms auf dem A-reichen Strang anzeigt. Die Auswertung des übrigen Musters und der Daten, die mit dem anderen Monomerenpaar erhalten wurden (Abb.24B), ergibt acht linke und acht rechte Nukleosomengrenzen, die mit den Buchstaben a-h gekennzeichnet wurden. Dank der hohen Auflösung der Sequenzgelelektrophorese, die es erlaubt, DNA-Fragmente aus der Exonukleaseanalyse zu trennen, die sich nur um 1 Nukleotid unterscheiden, wird deutlich, daß in den meisten Fällen die Grenzen des Nukleosoms durch eine dominierende Bande repräsentiert werden mit zusätzlich höchstens einer oder zwei schwächeren Banden, die sich um ein Nukleotid unterscheiden. Dies zeigt einmal, daß die Variabilität in der Position des Nukleosoms sehr klein sein muß



Abb.24 Die Analyse der nur an einem Ende markierten rekonstituierten Satelliten DNAs.

A. Das Satellitenmonomer (Sau96), das an beiden Enden (1) oder nur am rechten Ende (2) markiert war (nach Abspaltung von 4 bp am anderen Ende mit BstNI, s. Abb.23), wurde rekonstituiert und ein Gemisch von M1 und M2 mit Exonuklease III (0,5 E/ μ g DNA) für 18 Min verdaut. Die DNA Analyse erfolgte im 6% Sequenzgel. Die Buchstaben geben die zur Bande gehörige Histonoktamerposition an (s. auch Abb.25).

B. Das Satellitenmonomer (EcoRII), das an beiden Enden (2) oder nur am linken Ende (1) markiert war (nach Abspaltung von 4 bp am anderen Ende mit Sau96) wurde rekonstituiert und analysiert wie in A.

und zum anderen, daß die Exonuklease die Grenzen der Histon-DNA Wechselwirkung mit einer Genauigkeit von ± 1 Nukleotid angibt. Linkes und rechtes Ende der Positionen, wie sie in diesen Experimenten ermittelt wurden, sind in Abb.25 in die Sequenz der Maussatelliten DNA eingetragen.



Abb.25 Die Positionen der Nukleosomen, wie sie in vitro auf der Maussatelliten DNA gefunden werden. Anfang und Ende der Positionen in bezug auf die DNA-Sequenz sind oben angegeben. Die acht internen Positionen sind mit a-h gekennzeichnet. Die Strichelung der Positionen f und g weist auf ihr geringeres Vorkommen gegenüber den übrigen hin. Außerdem ist die Länge der intranukleosomalen DNA in Basenpaaren angegeben, wie sie sich aus der getrennten Bestimmung des rechten und linken Randes ergab.

Es ergeben sich acht spezifische interne Register, die regelmäßig im Abstand von durchschnittlich 9 bp angeordnet sind. Wenn man die Anfangs- und Endpositionen miteinander vergleicht, zeigt sich eine perfekte Korrelation mit der internen 9 bp Periodizität der Satelliten DNA (Abb.32 und Diskussion). Die rechten und linken Grenzen der Nukleosomenpositionen wurden unabhängig voneinander ermittelt, die daraus errechnete Länge der intranukleosomalen DNA liegt zwischen 143 bp und 145 bp. Die durchschnittliche

Größe von 144 bp unterscheidet sich von der kanonischen Nukleosomenkern DNA (145 bp) lediglich um 1 bp und unterstreicht damit die Zuverlässigkeit der Messungen.

2.3.4. Homologe und heterologe Histone binden auf der Maussatelliten DNA an die gleichen Positionen

Die Möglichkeit, daß die spezifischen Nukleosomenpositionen auf der Maussatelliten DNA von der Zusammensetzung und Herkunft der Histone abhängt, wurde mit heterologen Histonen vom Huhn getestet. Monomere Maussatelliten DNA wurde mit Histonen aus Hühnererythrozyten rekonstituiert, Partikel M2 mit Exonuklease III verdaut und auf einem Sequenzgel analysiert. Abb.26 zeigt, daß die Muster mit heterologen Histonen vom Huhn und homologen Histonen von der Maus identisch sind.

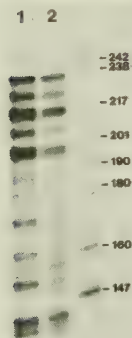


Abb.26 Die Nukleosomenpositionen auf der Maussatelliten DNA sind unabhängig von der Herkunft der Histone. Monomere Satelliten DNA (Sau96) wurde mit Histonen von Mausmononukleosomen (Bahn 1) oder Hühnererythrozytenmononukleosomen (Bahn 2), beide frei von H1 oder H5, rekonstituiert. Die weitere Analyse des Materials entspricht der Abb.22.

Das gleiche Ergebnis wird gefunden, wenn die Histone aus Hühnererythrozyten über Hydroxyapatitchromatographie gereinigt wurden, um eventuell vorhandene Reste von Nicht-histonproteinen zu entfernen. Es kann daraus geschlossen werden, daß die Positionierung der Nukleosomen in diesem

Fälle nicht von Histonvarianten oder Histonmodifikationen abhängt, die spezifisch für die Maus sind, noch daß begleitende Nichthistonproteine eine Rolle spielen.

2.3.5. Multiple spezifische Nukleosomenpositionen werden in vitro auch mit prokaryontischen DNA-Fragmenten erhalten

Um herauszufinden, ob die multiplen spezifischen Positionen, welche das Histonoktamer in vitro einnimmt, eine Eigenschaft nur der repetitiven Satelliten DNA ist, wurde ein prokaryontisches DNA-Fragment gleicher Länge (234 bp) mit Maushistonen rekonstituiert. Darüberhinaus sollte dieses Experiment klären, ob spezifische Positionierung von Nukleosomen nur eine Eigenschaft von eukaryontischer DNA ist. Die Analyse der Rekonstitutionsprodukte dieser DNA (HaeIII-Fragment von pBR322 DNA, 595-829 (64)) im Nukleoproteingel zeigt drei Partikel M1, M2 und M3 (Abb.27, Bahn 2), die den mit dem Maussatelliten-Monomer rekonstituierten Partikeln entsprechen (Abb.27, Bahn 1). Die beiden Muster unterscheiden sich lediglich im Laufverhalten der freien DNA, da das Satelliten-Monomer von 234 bp im Gel wandert, als wäre es 260 bp groß, ein Befund, der schon früher aufgefallen war. Dieser Tatbestand wurde ausgenutzt, um zu sehen, ob sich eine prokaryontische DNA gegenüber einer eukaryontischen DNA in ihrer Affinität zu den Histonen wesentlich unterscheidet. Die radioaktiv markierten Fragmente wurden gemischt und die Menge der freien DNA vor und nach der Rekonstitution miteinander verglichen, indem sie aus dem Nukleoproteingel ausgeschnitten und ihre Radioaktivität gemessen wurde. Es findet sich ein Verhältnis der freien DNA von 1:1,4 (Satellitenmonomer: pBR322-Fragment), wenn in die Rekonstitution gleiche Mengen an markierter DNA eingesetzt wurden. Dies zeigt, daß das pBR322-Fragment nur eine unwe-

sentlich niedrigere Affinität zu den Histonen hat, als die Satelliten DNA. Die drei rekonstituierten Partikel der pBR 322-DNA wurden einzeln isoliert und mit Exonuklease III untersucht (Abb.28).

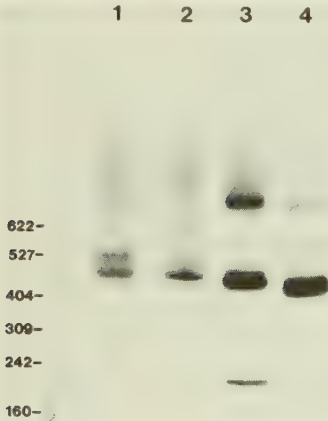


Abb.27 Die Rekonstitution von drei pBR322-Fragmenten unterschiedlicher Länge. Das Nukleoproteingel zeigt die Rekonstitutionsprodukte des Sau96 Satellitenmonomers (Bahn 1) und der 234 bp, 213 bp und 192 bp HaeIII-Fragmente der pBR322 DNA (Position 595-829, 1047-1260 und 4343-173 in der pBR322 Sequenz (64)), die in den Bahnen 2, 3 und 4 zu sehen sind. Man beachte die ungewöhnlich niedrige elektrophoretische Beweglichkeit der Satelliten DNA (Sau96, 237 bp), die etwa einer DNA von 260 bp entspricht.

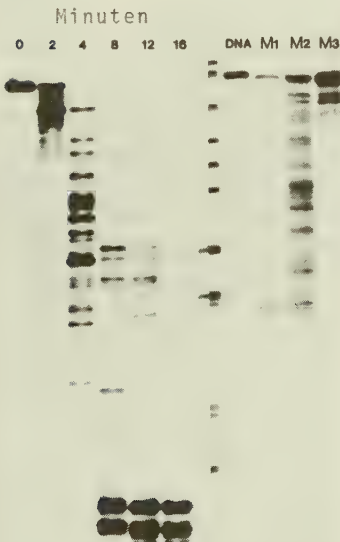


Abb.28 Spezifische Nukleosomenpositionen werden auch mit dem 234 bp HaeIII-Fragment der pBR322 DNA gefunden. Das an beiden 5'-Enden markierte HaeIII-Fragment wurde mit Exonuklease III (0,8 E/ μ g DNA) für die angegebenen Zeiten verdaut und die DNA im 6% Sequenzgel analysiert (links). Die Endverdauung der isolierten Partikel M1, M2 und M3 mit Exonuklease III (0,4 E/ μ g DNA, 15 Min), sowie unverdaute DNA sind rechts gezeigt. Das Autoradiogramm ist aus zwei Expositionen desselben Gels zusammengesetzt.

Wie bei allen bisher untersuchten DNA-Fragmenten ist das Histonoktamer in Partikel M1 mit dem Ende der DNA assoziiert, während es in M2 an verschiedene interne Positionen gebunden vorliegt und M3 wiederum vollständig resistent ist gegen einen Exonukleaseabbau. Freie DNA zum Vergleich gibt ein vollkommen anderes Muster mit Fragmenten von etwa 120 Nukleotiden Länge am Ende der Verdauung. Die exakten Positionen der Histonoktamere können aus dem gezeigten Muster von M2 nicht eindeutig bestimmt werden, da das Fragment an beiden Enden markiert ist und keine geeignete Nuklease zum Abspalten eines kurzen Endes zur Verfügung steht. Es wird allerdings deutlich, daß es wiederum multiple definierte Positionen sind, die die Histonoktamere einnehmen. Der Hauptunterschied zur Maussatelliten DNA liegt in der unregelmäßigeren Anordnung und in der größeren Variation in der Häufigkeit einzelner Positionen. Die Resultate, die mit weiteren pBR322-Restriktionsfragmenten erhalten werden, bestätigen die Existenz spezifischer Positionen auch auf prokaryontischer DNA. Das 213 bp HaeIII-Fragment zeigt im Rekonstitutionsexperiment eine ähnliche Häufigkeit von spezifischen Nukleosomenpositionen wie die Maussatelliten-DNA (nicht gezeigt), während sich bei einem 192 bp HaeIII-Fragment außer den Endpositionen nur eine interne Nukleosomenlokalisation findet (Abb.29). Mit Hilfe einer RsaI-Restriktionsstelle, die es ermöglichte, ein markiertes Ende dieser DNA abzuspalten, wurde ein nur 9 bp kürzeres Fragment erhalten, mit dem die interne Position des Histonoktamers eindeutig bestimmt wurde. Sie ist in Abb.29B gezeigt.



B

Abb.29 Im 192 bp HaeIII pBR322-Fragment besetzt das Histonoktamer nur eine interne Position.

A. Das 192 bp HaeIII Fragment wurde rekonstituiert, M1 und M2 zusammen isoliert und mit Exonuklease III (0,6 E/ μ g DNA) verdaut (links). Rechts ist dasselbe Experiment gezeigt, allerdings waren 9 bp vom rechten Ende des Fragmentes mit RsaI abgespalten und so eine DNA mit der Markierung nur am linken Ende erhalten worden.

B. Die Sequenz der 192 bp DNA mit der Position des Histonoktamers.

3. Diskussion

Die Rekonstitution von Chromatin ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Es wurde der Frage nachgegangen, ob die Bildung von Nukleosomen, die die Struktureinheit des Chromatins darstellen, insbesondere aber ob die Positionen, die das Histonoktamer in bezug auf die DNA-Sequenz in vivo einnimmt, in vitro rekonstituiert werden können. Eine sequenzspezifische Anordnung der Nukleosomen, die im englischen Sprachgebrauch auch als "phasing" bezeichnet wird, wurde mehrfach mit nativem Chromatin beobachtet und an Chromatin von hoch-repetitiver DNA genauer untersucht. Dieser Eigenschaft des Chromatins wurde eine Bedeutung bei der Regulation der Gen-expression zugeschrieben (s. Einleitung). Allerdings weiß man weder, auf welche Weise spezifische Nukleosomenpositionen dabei eine Rolle spielen, noch wie sie zustande kommen. Über den Mechanismus, wie Nukleosomen definierte Plätze einnehmen können, gehen die Meinungen auseinander. Einerseits gibt es die Vorstellung, daß ein an die DNA sequenzspezifisch bindendes Protein die Position der Nukleosomen festlegt, andererseits lassen Rekonstitutionsexperimente vermuten, daß ein solches Protein nicht nötig und die Anordnung der Nukleosomen alleine durch die DNA-Sequenz bestimmt ist. Da es von dem Mechanismus abhängt, ob die Nukleosomenpositionen über ein Genprodukt reguliert werden können oder von vorneherein festliegen, ist die Aufklärung des Mechanismus eine Voraussetzung zum Verständnis einer möglichen biologischen Bedeutung.

Die Rekonstitution von Nukleosomen im definierten in vitro System mit einer DNA, deren natives Chromatin analysiert ist, versprach eine Klärung, welche Faktoren zur spezifischen Anordnung der Nukleosomen nötig sind. Für die DNA, die bisher in Nukleosomen rekonstituiert wurde, liegen entweder keine in vivo Daten über die Positionen der Nukleoso-

men vor, oder es wurde prokaryontische DNA verwendet. Außerdem war es mit den gebräuchlichen Rekonstitutionssystemen und den Methoden zur Charakterisierung der rekonstituierten Nukleosomen nicht möglich, komplizierte Muster, wie sie für das Satellitenchromatin *in vivo* gefunden wurden, zu analysieren. Um dazu die Voraussetzungen zu schaffen, wurden verfeinerte Analysetechniken entwickelt, und es konnte gezeigt werden, daß sich bei der Rekonstitution von Nukleosomen mit DNA, die größer als 200 bp ist und die sich für die Untersuchungen als günstig erwies, drei verschiedene Partikel bilden. Die Anwendung von Exonuklease III und die anschließende Analyse mit der Sequenzgelelektrophorese erbrachte eine Klärung des Sachverhaltes und zeigte, daß nur eines der drei Partikel geeignet ist, den Einfluß der DNA-Sequenz auf die Positionen zu bestimmen. Damit gelang schließlich auch die Aufklärung des komplizierten Musters der Nukleosomenpositionen auf der Maussatelliten DNA *in vitro*. Die Bestimmung der Nukleosomengrenzen erfolgte durch den Abbau der nicht im Nukleosom gebundenen DNA mit Exonuklease III. Der Mechanismus dieses Enzyms wurde am Anfang eingehend untersucht und dabei eine gewisse Sequenzspezifität festgestellt. Es konnte nachgewiesen werden, daß die vier Nukleotide durch das Enzym verschieden schnell abgespalten werden. Diese Unterschiede sind jedoch zu klein, um den Nutzen der Exonuklease für die Kartierung der Nukleosomenpositionen einzuschränken.

3.1. Worauf beruhen die Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der die Nukleotide durch Exonuklease III abgespalten werden?

Zunächst konnte durch Experimente mit radioaktiv markierter Satelliten DNA der Maus gezeigt werden, daß der Abbau beider Stränge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit abläuft, wie man es bei einem von der DNA-Sequenz unabhängigen Enzym nicht erwarten sollte. Außerdem entstanden bei der Verdauung verschiedener DNAs mit Exonuklease III charakteristische Fragmentmuster, die auf eine Beeinflussung des Enzyms durch die Sequenz schließen ließen. Die Analyse der Spaltbarkeit aller 16 möglichen Dinukleotidbindungen zeigte, daß die Sequenzspezifität des Enzyms auf der Ebene der vier abzuspaltenden Mononukleotide zu suchen ist. Quantitative Untersuchungen an definierter DNA ergaben Unterschiede in der Abspaltbarkeit der einzelnen Nukleotide bis zu einem Faktor von 3. Dabei wurde auch die synthetische EcoRI Linker-DNA 5'GGAATTC 3' untersucht, zu der zahlreiche Strukturdaten aus einer Röntgenstrukturanalyse von Dickerson und Drew vorlagen (74), so u.a. die helikalen Twistwinkel der Dinukleotidbindungen dieser DNA. Dieser Winkel liegt zwischen zwei benachbarten Nukleotiden und variiert von 32° bis 42° (im Durchschnitt 36°, da etwa 10 Nukleotide eine Helixumdrehung von 360° ergeben). In den Verdauungsexperimenten von EcoRI Linker-DNA mit Exonuklease III korreliert nun schnelle Spaltung einer Dinukleotidbindung mit einem größeren helikalen Twistwinkel (Abb.30). Die gleiche Korrelation wurde schon von Lomonossoff et al. (75) für den Abbau dieser DNA mit Desoxyribonuklease I festgestellt. Dies weist darauf hin, daß für den Mechanismus der Exonukleaseverdauung die von der Nukleotidsequenz abhängige Konformation der DNA, wie sie sich unter anderem im Twistwinkel ausdrückt, eine wesentliche Rolle spielt. Für eine Reihe anderer Nukleasen wie Desoxyribonuklease I und Micrococcus-Nuklease wurde vor kur-

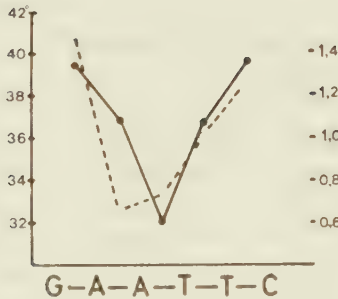


Abb.30 Die Spaltungsgeschwindigkeit von Bindungen in der EcoRI-Linker DNA korreliert mit den helikalen Twistwinkeln dieser Bindungen.

Es sind die helikalen Twistwinkel in Grad aufgetragen gegen die Nukleotidsequenz der untersuchten DNA (durchgezogene Linie), wie sie in Ref.74 bestimmt wurden. Dazu ist die relative Geschwindigkeit, mit der die Nukleotidbindungen durch Exonuklease III gespalten werden, gegen die Sequenz der DNA aufgetragen (gestrichelte Linie, s. auch Abb. 10).

zem gezeigt, daß die Geometrie des Zucker-Phosphatrückgrates der DNA für die präferentielle Spaltung von bestimmten Sequenzen wichtig ist, nicht aber die direkte Erkennung der Nukleobasen (76). Zu diesen, ursprünglich als unspezifisch angesehenen Enzymen, die vor allem die Struktur der DNA und nur indirekt die Sequenz erkennen, kann auch Exonuklease III gezählt werden. Im Unterschied zu dieser Gruppe von Nukleasen findet die Wechselwirkung der Restriktionsnukleasen vornehmlich zwischen Enzym und Nukleobase statt und weist eine viel höhere Spezifität auf.

3.2. Die Rekonstitution von Mononukleosomen und ihre Charakterisierung

Um den Effekt der DNA-Größe auf die Rekonstitution zu analysieren, wurden mehrere Fraktionen mit aufsteigender Größe von 150 bp bis 300 bp aus einer eukaryontischen Gesamt-DNA präpariert. Wegen der Komplexität einer solchen DNA besteht eine Fraktion aus Millionen von DNA-Stücken, die zwar gleich lang aber in ihrer Sequenz verschieden sind. Man kann mit dieser DNA im Experiment Effekte ausschließen, die auf individuellen Sequenzen beruhen, so daß sich vornehmlich die Auswirkung der DNA-Größe zeigt. Ein direkter Vergleich unterschiedlich großer Fraktionen ist aber nur möglich, wenn für jedes Rekonstitutionsexperiment exakt die gleichen Bedingungen eingehalten werden können oder ein innerer Standard vorliegt, gegen den jede Fraktion gemessen wird. Es stellte sich heraus, daß reproduzierbare Bedingungen durch Zugabe einer definierten Menge an DNA zu isolierten Histonen kaum zu verwirklichen waren, vor allem, weil das System sehr empfindlich auf Änderungen im Verhältnis DNA:Protein reagierte. Eine hohe Genauigkeit in diesem Verhältnis und in der Stöchiometrie der Histone zueinander läßt sich aber auf einfache Weise erhalten, wenn man die zu untersuchende radioaktiv markierte DNA zu einem 50-100 fachen Überschuß an nativen Mononukleosomen zugibt. Zur Rekonstitution wird anschließend die Ionenstärke auf 2M NaCl erhöht, wobei die Mononukleosomen in freie DNA und Histonoktamere dissoziieren. Durch kontinuierliches Entfernen des Salzes in der Dialyse bilden sich wieder Mononukleosomen zurück, so daß am Ende der Dialyse auch die markierte DNA als rekonstituiertes Material vorliegt. Jede zugesetzte radioaktive DNA konkurriert so mit derselben relativen Menge an unmarkierter mononukleosomaler DNA um die freien Histonoktamere. Damit können verschiedene DNA-Proben in ihrer Affinität zum Histonoktamer zuverlässig verglichen werden. In der Tat zeigen diese Exp-

erimente, daß die Histone bevorzugt an größere DNA binden, ein Umstand, der in Betracht gezogen werden muß, sollen definierte DNA-Sequenzen in ihrer Affinität zum Histonoktamer verglichen werden. Experimente mit sequenzeinheitlicher DNA zeigen weiterhin, daß selbst DNA ähnlicher Länge eine unterschiedliche Affinität zu den Histonen besitzen kann, wenn die Sequenzen verschieden sind. Beispiele für extreme Auswirkung der Sequenz auf die Rekonstitution sind beschrieben worden in Experimenten mit synthetischer homopolymerer DNA, wie poly (dA) • poly (dT). Diese Sequenz ist außerstande, mit Histonen nukleosomale Strukturen zu bilden, während z.B. poly d(AT) dies tut (77-79). Ein Beispiel eines natürlichen Chromatins, in dem die verminderte Fähigkeit der DNA mit Histonen Nukleosomen zu bilden, eine Rolle spielen könnte, stellt die ori-Region auf dem Chromosom des Papovavirus SV 40 dar. Für diese biologisch wichtige Region des Virusminichromosoms wurde gezeigt, daß sie in vivo weitgehend frei von Nukleosomen ist und damit für die Enzyme der Replikation und Transkription wahrscheinlich eine bessere Wechselwirkung mit der DNA gegeben ist (80,81). Da ähnliche Befunde mit der in vitro Rekonstitution erhalten wurden (32), könnte die DNA-Sequenz, die in dieser Region sechs ungewöhnliche GC-Bereiche besitzt, die Ursache für das Fehlen von Nukleosomen sein.

Die Analyse des rekonstituierten Materials erfolgte mit einem Gelelektrophoresesystem, das zuerst von Varshavsky (70) und später insbesondere von Garrard (71) zur Analyse von Nukleosomen verwendet wurde. Diese "Nukleoproteingele" unterscheiden sich vom normalen Gelsystem zur Analyse von DNA in der Hauptsache durch eine sehr niedrige Ionenkonzentration des Puffers. Dadurch wird während der Elektrophorese eine Dissoziation der Histone und der DNA, die eine gegensätzliche Ladung tragen, verhindert und die Komplexe als solche nach Ladung, Größe und Form getrennt. Dieses Gelsystem wurde in der Vergangenheit insbesondere zur Analyse von

nativem niedermolekularem Chromatin und Komplexen aus Nukleosomen mit Nichthistonprotein angewandt (69-71). In unserem Labor erwies sich die Methode speziell für die Analyse von rekonstituiertem Material als sehr vorteilhaft dank ihrer hohen Auflösung im mononukleosomalen Bereich und der Möglichkeit, gleichzeitig DNA und rekonstituiertes Material nachweisen zu können. Es wurde damit gezeigt, daß rekonstituierte Mononukleosomen in drei Partikeln vorliegen können, die mit Hilfe dieses Gelsystems getrennt isoliert und untersucht werden konnten, was mit der herkömmlichen Methode der Rohrzuckergradientenzentrifugation nicht gelang.

Sowohl mit DNA definierter Sequenz als auch mit DNA nicht einheitlicher Sequenz wurden bei der Rekonstitution ab etwa einer Fragmentlänge von 200 bp drei Partikel gefunden, M1, M2 und M3. Die Untersuchung dieser Partikel mit Exonuklease III alleine oder zusätzlich mit Nuklease S1 hatte zum Ergebnis, daß sowohl bei Partikel M1 als auch M2 genau ein Histonoktamer mit der DNA assoziiert ist und beide Partikel somit Mononukleosomen darstellen. Sie unterscheiden sich lediglich in der Position des Histonoktamers. In Partikel M1 sind die Histone mit den terminalen 145 bp der DNA assoziiert und schließen so mit einem Ende der DNA ab, während das andere DNA-Ende frei vorliegt. Ist die DNA zwischen 150 und 200 bp groß, stellt M1 das einzige Produkt dar, das sich bei der Rekonstitution bildet. Übersteigt die Größe der DNA 200 bp, erscheint als weiteres Partikel M2, das in der Elektrophorese langsamer wandert und so von M1 abgetrennt werden kann. Es wurde bei allen untersuchten DNA-Fragmenten zwischen 210 bp und 260 bp gefunden. Mit einer DNA kleiner als 200 bp scheint Partikel M2 sehr nahe bei oder mit M1 im Gel zu wandern, wie es für das 192 bp pBR322-Fragment in Abb.27 gezeigt ist. M2 besitzt zwei freie DNA-Enden und ein Histonoktamer in verschiedenen Positionen auf der Mitte der DNA. Mit diesem Partikel war es möglich, den Einfluß der DNA-Sequenz auf die Position des Histonoktamers zu untersuchen,

da im Gegensatz zu M1 keine Beeinflussung der Position vom Ende der DNA vorliegt. Bei einer DNA-Länge von mehr als 260 bp überwiegt Partikel M3, das von den drei rekonstituierten Partikeln in der Elektrophorese am langsamsten wandert. Die DNA dieser Fraktion ist vollständig gegen den Abbau mit Exonuklease III geschützt und es ist deshalb anzunehmen, daß zusätzlich zum Histonoktamer weitere Histone an die DNA gebunden sind. Für DNA größer 260 bp ist es wahrscheinlich ein zweites Histonoktamer, das binden kann, wie es bei dieser DNA-Länge auch in natürlichen Chromatinproben gefunden wurde (82).

Der Unterschied im Laufverhalten von M1 und M2 in der Gelelektrophorese ist überraschend. Anfänglich wurde als Ursache vermutet, daß M2 mehr Histon enthält als M1, ähnlich einem H1-haltigen nativen Mononukleosom, das im Gel ebenfalls eine verminderte Mobilität zeigt. Zusätzliche Bindung von H1 aber schützt 165 bp vor dem Angriff von Exonuklease III (83), während die Analyse von M2 mit Exonuklease III eine geschützte Region von 145 bp ergibt (Abb.18 und Abb.20) und kein Anzeichen für eine Retardation des Enzyms oberhalb von 145 bp vorlag. Dieses Ergebnis spricht somit gegen eine zusätzliche Bindung von Histon. Wenn sich aber M1 und M2 weder in ihrem DNA- noch in ihrem Proteingehalt unterscheiden, kann nur ihre ungleiche Form für den Unterschied im Laufverhalten verantwortlich sein.

Das Laufverhalten der Partikel im Gel wird relativ wenig von der Länge der DNA bestimmt. So verlangsamten sich im Gegensatz zur freien DNA die M1-Partikel mit steigender Länge der Fragmente nur unwesentlich (Abb.14). Auch die H1,H5-freie Mononukleosomenfraktion aus nativem Chromatin ergibt im Gel eine relativ scharfe Bande trotz der heterogenen DNA-Längen von 145 bp - 200 bp (Abb.11A). Dies zeigt, daß wahrscheinlich die Form der Partikel eine größere Rolle spielt als die Länge der DNA. Wie Abb.31 zeigt, unterschei-

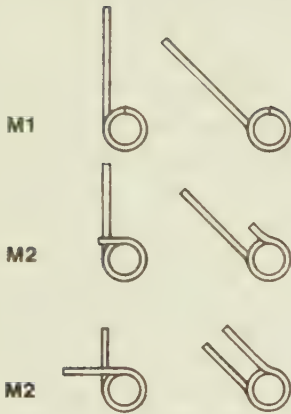


Abb.31 Eine maßstabgetreue Wieder-
gabe der rekonstituierten nukleo-
somaln Partikel M1 und M2.
Die erste Reihe zeigt ein Histon-
oktamer am Ende der DNA (Partikel
M1), in der zweiten Reihe ist die
Entfernung vom Ende etwa 20 bp und
in der untersten Reihe ist die Po-
sition des Histonoktamers genau in
der Mitte der DNA (Partikel M2).
Die DNA entspricht einer Länge von
240 bp und ist $1\frac{3}{4}$ mal um das
Histonoktamer gewickelt. Jeweils
zwei denkbare Strukturen der Par-
tikel sind gezeigt.

den sich gerade M1 und M2 in ihrer Form, da M1 ein langes
freies DNA-Ende besitzt, während M2 zwei kürzere Enden hat.
Man kann sich vorstellen, daß M2 bei der Wanderung im Gel
einen höheren Widerstand erfährt als Partikel M1 mit nur ei-
nem freien DNA-Ende. Dieser Effekt sollte von der Länge der
beiden überhängenden Enden abhängen und könnte so erklären,
warum er sich erst ab einer DNA-Größe von etwa 200 bp be-
merkbar macht. Damit stimmt überein, daß Partikel mit Nu-
kleosomenpositionen relativ nahe am Ende der DNA in der Gel-
elektrophorese näher bei M1 als bei M2 gefunden werden
(nicht gezeigt). Daß ein distinktes Partikel M2 erst ab 200
bp in Erscheinung tritt, erklärt, weshalb normalerweise in
nativen Mononukleosomen, die einen Größenbereich von 145 bp
- 200 bp umfassen, kein solches Partikel gefunden wird.

3.3. DNA-Fragmente definierter Sequenz können zu Nukleosomen mit spezifischen internen Positionen rekonstituiert werden

Die Rekonstitutionsexperimente mit verschiedenen Monomeren der Maussatelliten-DNA und einem pBR322-Fragment gleicher Größe zeigen, daß von den etwa 90 möglichen sich um ein Basenpaar unterscheidenden Nukleosomenpositionen einer 234 bp großen DNA tatsächlich nur ein geringer Teil verwirklicht wird. Im Falle der Satelliten-DNA sind dies 8 Positionen und bei dem 234 bp großen pBR322-Fragment wurden mindestens 9 nachgewiesen. Bisher berichteten drei Arbeitsgruppen über spezifische Nukleosomenpositionen mit rekonstituierter DNA. Chao et al. (33) rekonstituierten *in vitro* ein 144 bp und 203 bp großes DNA-Fragment, das die *lac*-Kontrollregion aus *E.coli* enthält, mit Histonen. Auf der 144 bp großen DNA wurden drei verschiedene Positionen des Histonoktamers wahrscheinlich gemacht, die alle 20-30 bp über ein Ende der DNA hinausragen. Nukleosomen, bei denen der Histonkern über den Rand der DNA hinausragt, stellen eher die Ausnahme als die Regel dar. Tatchell und Van Holde fanden mit Fraktionen aus Gesamt-DNA von Hühnererythrocyten, daß das rekonstituierte Nukleosom von 120 bp - 161 bp großer DNA stets an einem Ende der DNA beginnt und sie maximal an den Histonkern gebunden ist (55). Auch in der vorliegenden Arbeit kann dies für die untersuchten DNA-Fragmente bestätigt werden (die DNA wird lediglich im Maussatellitenrekonstitutat um maximal 5 bp vom Histonoktamer überragt).

Simpson und Stafford rekonstituierten Mononukleosomen mit einem 260 bp langen DNA-Fragment des 5S rRNA-Genes aus Seeigeln (35). Sie erhielten mit diesem Fragment nur eine Nukleosomenposition, die nach ihrer Analyse 20 bp vom äußeren Rand des Fragmentes entfernt war. Ramsay et al. rekonstituierten ein 145 bp Fragment aus *E.coli* und fanden keine symmetrische Position des Histonoktamers, die genau die 145

bp der DNA umfaßt, sondern eine Verschiebung des Histonoktamers nach einer Seite um etwa 20 bp (34). Beide Arbeitsgruppen verwendeten DNAase I zur Analyse des unfraktionierten rekonstituierten Materials. Die Verdauung mit DNAase I stellt eine alternative Methode dar, um die Nukleosomenposition in bezug auf die DNA-Sequenz zu bestimmen. Das Entstehen einer 10 bp Fragmentleiter mit endmarkierter DNA zeigt dabei eine spezifische Positionierung des Histonoktamers an, und die genaue Position kann anhand der charakteristischen Intensitätsverteilung dieser Fragmente hergeleitet werden (84,85). Allerdings wird auch deutlich, daß die komplizierte Anordnung der Nukleosomen auf der Maussatelliten DNA mit dieser Methode nicht hätte analysiert werden können, da die Überlagerung von acht 10 bp Leitern ein Muster ergibt, das nicht mehr interpretiert werden kann. Lediglich die einfache Situation in Partikel M1 läßt die richtige Analyse der spezifischen Endposition mit dieser Methode erwarten. In der vorliegenden Arbeit wurde stets Partikel M1 als das Hauptprodukt der Rekonstitution gefunden. Die Endpositionen, die bei M1 vorliegen, lassen aber keine eindeutigen Aussagen über eine sequenzabhängige Positionierung des Histonoktamers zu, da im wesentlichen ein DNA-Endeffekt, der unabhängig von der Sequenz ist, zugrunde liegt. Dies muß man bedenken, wenn unfraktioniertes rekonstituiertes Material mit DNAase I analysiert wird und wie in Ref. 34 und 35 Positionen am Ende oder nahe dem Ende des DNA-Fragmentes gefunden werden.

3.4. Der Vergleich der in vitro und in vivo erhaltenen Resultate zeigt, daß die Anordnung der Nukleosomen in vivo weitgehend von der DNA-Sequenz bestimmt wird

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sich in vitro spezifische Nukleosomenpositionen mit Satelliten DNA aus der Maus ausbilden können. Es stellt sich die Frage, ob diese Positionen, die sich nur aus der Wechselwirkung von Histonoktamer und DNA ergeben, auch im nativen Chromatin zu finden sind. Die Maussatelliten DNA ist nun der erste Fall, für den Informationen über die Nukleosomenpositionierung sowohl in vitro als auch in vivo vorliegen. Diese Ergebnisse sind in Abb.32 gezeigt. Den Positionen, die im nativen Chromatin aus Mausleber kartiert werden konnten (19) und die für ungefähr 190 bp des 234 bp großen Maussatellitenmonomers bekannt sind, stehen die rekonstituierten Positionen gegenüber, die etwas mehr als ein Drittel der DNA umfassen. Direkt verglichen werden kann der Teil der Sequenz, der sich in beiden Arbeiten überschneidet und in Abb.32 eingerahmt ist.

Der Vergleich zeigt eine weitgehende Übereinstimmung der in vivo und in vitro erhaltenen Resultate. Keine der in vitro gefundenen Positionen unterscheidet sich von den entsprechenden Positionen in vivo um mehr als ± 1 bp. Die hervorstechendste Gemeinsamkeit beider Nukleosomenkarten ist der Beginn und das Ende der Positionen an homologen Stellen der Satelliten-DNA. Das ergibt sich aus der inneren Struktur dieser DNA. Das Monomer des Maussatelliten von 234 bp ist nämlich wiederum zusammengesetzt aus 27 repetitiven Einheiten von 9 bp Länge, die drei nahe verwandte Sequenzen umfassen: GA₅CGT, GA₅TGA und GA₅ACT (86, s. Abb.32). In vitro wie im Zellkern werden nun Beginn oder Ende der Nukleosomenpositionen immer an homologer Stelle dieser 9 bp gefunden. Nukleosomen und Sequenz sind also miteinander in Phase, wobei die Regelmäßigkeit, mit der dies in vitro der Fall ist,



Abb. 32 Der Vergleich der in vitro rekonstituierten Nukleosomenpositionen (A) mit den im Maussatellitenchromatin in vivo gefundenen Positionen (B). A. Die Sequenz des 234 bp großen Monomeren der Maussatelliten DNA ist im Bild so angeordnet, daß acht Untereinheiten übereinanderstehen und größtmögliche Homologie ergeben. Darunter sind die 9 bp großen Wiederholungseinheiten angegeben, aus denen sich die jetzige 234 bp große Einheit entwickelt hat (52). Im oberen Teil der Sequenz sind die Anfänge der Nukleosomenpositionen ([), darunter die Enden (]) eingetragen, wie sie unabhängig voneinander nach in vitro Rekonstitution gemessen wurden. Der Beginn der Positionen ist mit a-h gekennzeichnet (s. auch Abb. 22), ihr Ende zusätzlich mit einem Stern. B. Die Enden der 16 Nukleosomenpositionen, wie sie in vivo auf der Maussatelliten DNA gefunden wurden (19), sind gezeigt. Sie sind mit A*-p* gekennzeichnet. Die punktierte Linie zeigt die Region an, die nicht analysiert wurde.

Der Teil der Sequenz, für den sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Daten über das Ende der Nukleosomenpositionen vorliegen, ist in A und B eingezeichnet.

auffällt. Das wird besonders deutlich, wenn die Positionen der rechten Nukleosomengrenzen betrachtet werden (Abb.32A unten). Von neun rekonstituierten Positionen endet die intranukleosomale DNA bei sechs an Position 2 und zwei an Position 1 der 9 bp Einheit (...¹²³⁴⁵⁶⁷⁸⁹GA¹²³⁴⁵⁶⁷⁸⁹AA¹²³⁴⁵⁶⁷⁸⁹...., die offene Klammer zeigt ins Zentrum des Nukleosoms). Dasselbe ist auch für 14 von 16 in vivo Positionen gefunden worden, die alle an Position 1 oder 2 der 9 bp Einheit enden (Abb.32B). Damit wird klar, daß die Platzierung der Nukleosoms an den entsprechenden Positionen nur von der DNA-Sequenz abhängen kann. Diese Schlußfolgerung wird weiter gestützt durch Experimente mit Histonen, die einmal aus Hühnererythrozyten isoliert und über Hydroxiapatit-Chromatographie sorgfältig von allen eventuell vorhandenen Nichthistonproteinen gereinigt wurden und zum anderen von der Maus stammten. In beiden Experimenten ergaben sich identische Nukleosomenpositionen, was zeigt, daß sie weder von Histonvarianten, die spezifisch für die Maus sind, noch von Nichthistonproteinen abhängen.

Eine Besonderheit stellt Position D dar, die ausschließlich in vivo gefunden wird und nicht in das beschriebene Muster, das in Phase mit der 9 bp Wiederholungseinheit der Satelliten DNA ist, hineinpaßt. Ein weiterer Unterschied ist durch das Fehlen von zwei Positionen in vivo an homologen Stellen gegeben (Position c und d in Abb.32A, eingerahmter Bereich). Geringe Differenzen finden sich auch in der Häufigkeit von Position f und g, welche im rekonstituierten Chromatin weniger häufig vorkommen als in vivo. Die Ursache dieser Unterschiede sind einmal in der besonderen Struktur des Chromatins in vivo, die sich in vitro wegen der Kürze der DNA nicht ausbilden kann, zu suchen und zum anderen in besonderen Zellfaktoren, die im Rekonstitutionssystem fehlen. Histon H1 und H1°, die in nativem Satellitenchromatin gefunden wurden (20), im in vitro Experiment aber nicht zugegeben wurden, mögen ein Faktor sein; eine Rolle spielt aber sicherlich die kompakte und hochgeordnete Chromatin-

struktur, wie sie in vivo vorliegt und typisch für den heterochromatischen Zustand einer hochrepetitiven DNA ist.

3.5. Die Endpositionen der Nukleosomen in vitro werden von der DNA-Sequenz und dem DNA-Endeffekt bestimmt

Obwohl Partikel M2 die Summe aller spezifischen internen Nukleosomenpositionen darstellt, ist es gewöhnlich nicht das vorherrschende Rekonstitutionsprodukt, sondern wird von Partikel M1 übertroffen, das die beiden Positionen am Ende des DNA-Fragmentes repräsentiert. Bestimmt werden Endpositionen über die innere Grenze des Nukleosoms, und es kann festgestellt werden, wie weit diese Grenze vom DNA-Ende entfernt ist. Ein präzises Bild der Endpositionen in Partikel M1 ergab sich mit der Analyse der drei rekonstituierten Satellitenmonomere, die nur um wenige Basenpaare auf der Wiederholungseinheit der Satelliten DNA verschoben sind. Das Ergebnis ist schematisch in Abb.33 angegeben. Übereinstimmend für alle drei Monomere zeigt sich die innere Grenze genau an der selben Stelle der DNA-Sequenz, die überdies homolog ist mit denen der acht internen Phasen. Daraus ergibt sich zwangsläufig, daß nicht immer genau 145 bp DNA mit dem Histonoktamer assoziiert sind, sondern abhängig vom verwendeten Monomer das Histonoktamer am äußeren Rand 0-5 bp übersteht. Das Resultat ist nicht auf die verwendete Analyse-methode zurückzuführen, da mit der gleichen Methode die inneren Grenzen der Endpositionen auf einem 192 bp pBR322-Fragment 145 bp von einem Ende und 146 bp vom anderen Ende entfernt gefunden wurden (Abb.33). Diese Resultate sprechen dafür, daß auch die terminalen Nukleosomenpositionen auf der monomeren Satelliten DNA Einflüssen der Sequenz unterworfen sind und nicht alleine von den Enden der DNA bestimmt werden.

Warum die Endposition im Rekonstitutionsexperiment so bevorzugt werden, wie zuerst von Tatchell und Van Holde ge-

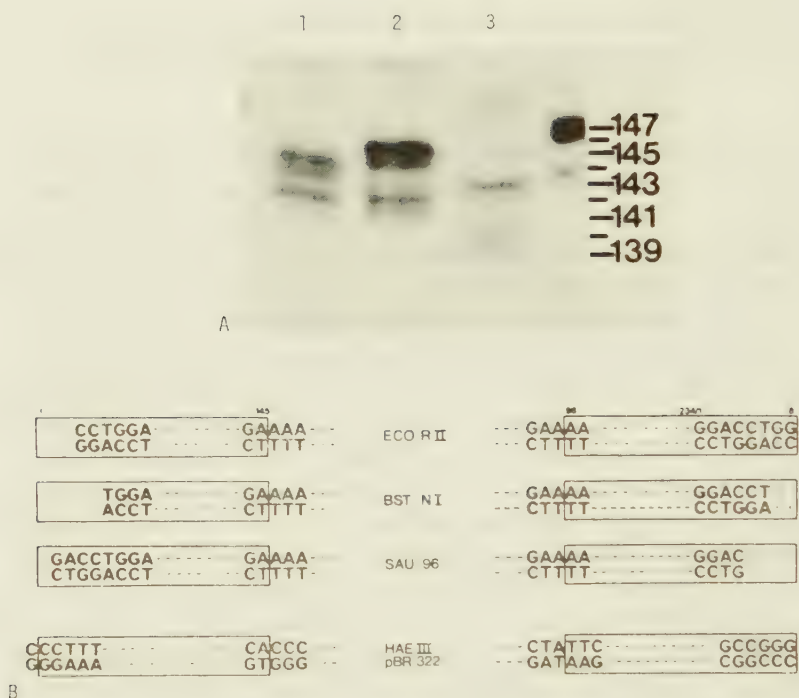


Abb.33 Sechs verschiedene in vitro erhaltene Endpositionen des Histonoktamers auf der Maussatelliten DNA.

A. Die drei monomeren Satelliten DNAs (Abb.21) wurden rekonstituiert und Partikel M1 nach Exonukleaseverdauung auf einem 6% Sequenzgel analysiert (wie in Abb.22). Nur die zum inneren Rand des Nukleosoms gehörenden Banden sind gezeigt. Bahn 1, 2 und 3 entsprechen den Sau96, EcoRII und BstNI Monomeren. Die DNA Längen sind am rechten Rand in Nukleotiden angegeben.

B. Der linke und rechte Teil der drei monomeren Satelliten DNAs ist gezeigt mit den in vitro gefundenen Endpositionen des Histonoktamers (umrahmt). Der innere Rand wurde durch eine Reihe unabhängiger Experimenten, wie sie in A gezeigt sind, bestimmt, während der äußere Rand extrapoliert wurde (mit der Annahme, daß intranukleosomale DNA eine Länge von 145 bp besitzt). Das Histonoktamer schließt entweder mit der DNA ab oder reicht 1-5 bp über die DNA hinaus. In der 4. Reihe sind zum Vergleich beide Endpositionen des 192 bp HaeIII pBR322-Fragmentes zu sehen.

zeigt wurde (55), ist nicht klar. Da aber diese Partikel für das Verständnis der sequenzspezifischen Wechselwirkung zwischen DNA und Histonoktamer keine Rolle spielen, wurde auf eine eingehendere Untersuchung dieses Phänomens verzichtet. Allerdings könnte es für andere in vitro Experimente Interesse erlangen, mit denen z.B. die Abhängigkeit der Transkription von der Position des Nukleosoms untersucht wird. Da die Endpositionen als Partikel M1 von den übrigen Positionen (Partikel M2) elektrophoretisch abgetrennt werden können, ist die Möglichkeit gegeben, mit der richtigen Wahl des DNA-Fragmentes fast beliebige Positionen in bezug auf die DNA-Sequenz herbeizuführen. Dieser Umstand könnte in Zukunft dazu beitragen, die biologische Auswirkung der spezifischen Nukleosomenpositionen zu klären.

Die Tatsache, daß bei den terminalen Nukleosomenpositionen auf der Maussatelliten DNA einige Basenpaare am äußeren Nukleosomenrand fehlen, bedeutet auch eine terminale Stelle fester Bindung zwischen DNA und Histon weniger. Dies könnte erklären, warum die Exonuklease III am äußeren Rand bis in die intranukleosomale DNA hinein verdaut, während es für den inneren Rand des Nukleosoms nicht der Fall ist (s. auch Abb.19B). Damit stimmt überein, daß die eine Endposition ohne zurückgezogenes DNA-Ende am rechten Rand des EcoRII-Monomeren am stabilsten gegen den Abbau ist.

Wird einmal die intranukleosomale DNA angegriffen, schreitet der Abbau fort und kommt nach etwa 20 bp zum Stehen, wahrscheinlich aufgrund einer besonders festen DNA-Histonbindung. Dieses Ergebnis unterstützt den Befund von Weischet et al. (87), der besagt, daß eine interne Region von 100 bp im Nukleosom besonders fest an den Histonkern gebunden ist. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Arbeitsgruppe von Mirzabekov (88) in ihrem Nukleosomenmodell, in dem nur ein Strang der terminalen 20 bp der nukleosomalen DNA in Kontakt mit den Histonen ist, während es für die internen 100 bp beide Stränge sind und somit diese Region fe-

ster als die Randsequenzen gebunden sind.

3.6. Was ist die strukturelle Basis der Nukleosomenpositionierung im Maussatellitenchromatin in vitro?

In Rekonstitutionsexperimenten mit verschiedenen DNA-Fragmenten des prokaryontischen Plasmids pBR322 wurden spezifische Nukleosomenpositionen in ähnlicher Häufigkeit gefunden, wie sie mit der Maussatelliten DNA erhalten wurden. Dies macht deutlich, daß spezifische Positionen wohl ein grundsätzliches Phänomen der DNA-Histonwechselwirkung darstellen. Es wird dadurch nicht die Möglichkeit ausgeschlossen, daß in vivo weitere Faktoren die Anordnung der Nukleosomen beeinflussen können, wie der in vivo/in vitro Vergleich für die Maussatelliten DNA zeigt. Wenn außer DNA und Histonen keine weiteren Faktoren im in vitro Experiment vorliegen, stellt sich die Frage, aus welchen Gründen das Histonoktamer nicht jede beliebige Position auf der DNA einnehmen kann? Bedenkt man die sehr große Zahl verschiedener DNA-Sequenzen, die alle in Nukleosomen verpackt werden, ist eine direkte Erkennung von spezifischen Nukleotidsequenzen durch das Histonoktamer unwahrscheinlich. Diese Überlegung steht im Einklang mit der Tatsache, daß bis jetzt noch kein einfaches Sequenzmotiv gefunden werden konnte, welches das Nukleosom an eine definierte Stelle dirigiert. Vielmehr scheint die Geometrie des DNA-Moleküls dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Wie kürzlich gefunden wurde, hängt auch die dreidimensionale Struktur der DNA von ihrer Sequenz ab. Wie Röntgenstrukturanalysen von kurzen synthetischen DNA-Fragmenten zeigen, ist die DNA tatsächlich kein monoton gerades und gleichförmiges Molekül wie bisher angenommen, sondern sie unterliegt in Abhängigkeit von der Nukleotidsequenz Strukturänderungen ihres Zucker-Phosphatrückgrates

(89). Das heißt, daß eine Sequenzspezifität auch über die Geometrie des Zucker-Phosphatrückgrates der DNA vermittelt werden kann, wie es in dieser Arbeit für die Exonuklease III diskutiert wird. Ein solcher Mechanismus wurde für einige sogenannte unspezifische Nukleasen wie DNAase I, die ebenfalls eine "Sequenzspezifität" besitzen, gezeigt (90). Diese Nukleasen erkennen, wie Drew und Travers beschreiben, bestimmte Konformationen des Zucker-Phosphatrückgrates der DNA und nicht direkt die Nukleobasen selbst (91). Somit erklärt sich auch die Eigenschaft dieser Enzyme, zwar definierte Positionen auf der DNA zu erkennen, aber keine einheitliche Erkennungssequenz zu besitzen, die denen der Restriktionsnukleasen vergleichbar wäre. Sie sind in der Lage, eine Vielzahl ähnlicher Sequenzen zu spalten, denen wahrscheinlich gemeinsam ist, daß sie eine identische Struktur im DNA-Rückgrat besitzen, die schließlich von der Nuklease erkannt wird. Was die Nukleosomenbildung betrifft, könnten solche Strukturen der Doppelhelix dafür verantwortlich sein, daß sich eine DNA besser oder schlechter um den Histonkern wickelt.

Ein besonderer struktureller Parameter des DNA-Moleküls, der die Nukleosomenpositionen beeinflussen könnte, ist die Biegsamkeit der DNA. Da sich die DNA bei der Bildung eines Nukleosoms fast zweimal um das Histonoktamer herumwickeln muß, werden wahrscheinlich die DNA-Abschnitte zur Nukleosomenbildung herangezogen, die am biegsamsten sind. Eine solche Biegsamkeit soll, so wird aus theoretischen Überlegungen geschlossen, von der Nukleotidsequenz abhängig sein (92,93). Die Biegsamkeit gibt die Fähigkeit der DNA an, sich z.B. bei der Nukleosomenbildung als Ergebnis einer Interaktion mit den Histonen zu biegen. Kürzlich wurde nun natürlich vorkommende DNA gefunden, die bereits ohne eine solche Wechselwirkung mit Histonen oder anderen Proteinen gebogen ist (94). Diese DNA besitzt wegen ihrer gebogenen Struktur eine ungewöhnlich niedrige Beweglichkeit in der

Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Wu und Crothers gelang es, das Biegungszentrum der DNA zu bestimmen, und sie machten wahrscheinlich, daß die Biegung der DNA in der Sequenz $CA_{5-6}T$, die mehrmals symmetrisch um dieses Zentrum vorkommt, ihre Ursache hat. Das Sequenzstück wiederholt sich im Abstand von 10 bp, was einer Umdrehung der DNA-Helix entspricht, und damit kann sich die Besonderheit ihrer Struktur addieren und maximal auf die Gesamtgeometrie der DNA übertragen werden. Interessanterweise ist diese Biegungssequenz $CA_{5-6}T$ in bezug auf die Sequenz der inneren Wiederholungseinheit der Maussatelliten-DNA GA_5N_3 sehr ähnlich. Außerdem ist das Wiederholungsintervall der Satellitensequenz von 9 bp fast identisch mit den 10 bp der Biegungssequenz. Wie die gebogene DNA zeigt die Satelliten DNA im Polyacrylamid-Gel eine ungewöhnlich geringe Mobilität (in Abb.27 gezeigt für das 234 bp Monomer), eine schon lange bekannte Tatsache, die ursprünglich zu einer falschen Längenbestimmung des Satellitenmonomers geführt hat mit 260 bp statt der richtigen Länge von 234 bp. Diese Daten machen es sehr wahrscheinlich, daß auch die Satelliten DNA gebogen ist. Was sind nun die Konsequenzen für die Bildung von Nukleosomen und ihre Positionen? Für eine DNA, die unidirektional gebogen ist, sollten diejenigen Nukleosomenpositionen bevorzugt werden, die auf der Innenseite der Biegung liegen (95). Werden mehrere Positionen gefunden, sollten sie einen Abstand von etwa 10 bp haben, der gewährleistet, daß sie stets auf derselben Seite der DNA Helix liegen. Finden sich Positionen, die einen anderen Abstand besitzen und auf beiden Helixseiten liegen, ist eine Beeinflussung der Nukleosomenpositionen durch die Biegung der DNA relativ unwahrscheinlich. Für die rekonstituierten Maussatellitennukleosomen wurde nun gefunden, daß ihre Positionen einen Abstand von 10, 9, 10, 11, 9, 7, 11 bp voneinander haben, d.h. diese Daten stehen im Einklang mit der Vorstellung, daß die Biegung der Maussatelliten DNA die gefundene Anordnung der Nukleosomen begünstigt.

Es ist für das Nukleosom gezeigt worden, daß es feste Bindungsstellen zwischen DNA und Histon in einem Abstand von etwa 10 bp auf der DNA gibt (84,85). Daraus ergeben sich 30 Bindungsstellen zwischen beiden DNA-Strängen und dem Histonkern auf einer Länge von 145 bp. Die Verschiebung der Nukleosomenposition um 1 bp betrifft somit 30 solcher Kontaktstellen, die gelöst werden müssen. Dies mag erklären, warum die Positionen in vivo wie in vitro so präzise sind und keine statistische Verteilung um eine mittlere Position vorliegt. Für die Kontakte zwischen DNA und Histonkern wurde kürzlich mit der Röntgenstrukturanalyse des Nukleosoms gefunden, daß die DNA an einigen dieser Stellen besonders stark gebogen ist (96). Es wurde angeführt, daß gewisse DNA-Sequenzen aufgrund ihrer Flexibilität dort bevorzugt, andere wegen ihrer Rigidität vermieden werden und dies die Grundlage einer sequenzspezifischen Anordnung der Nukleosomen sein könnte. Da es wahrscheinlich eine ganze Reihe von verschiedenen Sequenzen gibt, die dieselbe Flexibilität besitzen, werden genaue Strukturdaten über die DNA nötig sein, um anhand der DNA-Sequenz Nukleosomenpositionen vorherbestimmen zu können. Die Sequenzerkennung der Nukleosomen gleicht somit dem Mechanismus der "unspezifischen" Nukleasen, die vor allem die Struktur der DNA und nur indirekt die Sequenz erkennen. Was die Maussatelliten DNA betrifft, ist eine Besonderheit ihrer Sequenz das periodische Vorkommen von oligo(dA)-Bereichen, die ein Teil der inneren Wiederholungssequenz GAAAAANNN ausmachen. Die Vermutung, daß (dA)-reiche Regionen schlechte Bindungsstellen für die Histone darstellen, wird gestützt durch Ergebnisse aus Rekonstitutionsexperimenten, die zeigen, daß synthetische poly (dA) poly (dT) DNA nicht in der Lage ist, mit Histonen eine Nukleosomenstruktur auszubilden (77,78) und oligo (dA)-Bereiche von 20 bp die Bildung eines Nukleosoms beeinträchtigen (95,97).

Um die Bedeutung der oligo (dA)-Bereiche in der Satelliten DNA für die Nukleosomenpositionen zu erfahren, wurden die möglichen Kontakte zwischen der Satellitensequenz und dem Histonkern untersucht. Für jede mögliche Nukleosomenposition auf der Satelliten DNA wurden die 30 Kontaktstellen etwa im 10 bp Abstand erfaßt unter besonderer Beachtung der oligo (dA)-Bereiche. Es zeigt sich, daß in den in vitro gefundenen Nukleosomenpositionen die Kontakte mit diesen Bereichen maximal vermieden werden, wenn ein Abstand von 10,2 bp gewählt wird. Dies könnte bedeuten, daß tatsächlich das Minimieren ungünstiger Kontakte die treibende Kraft für eine spezifische Positionierung der Nukleosomen auf der Maussatelliten DNA ist. Um dies zu beweisen, bedarf es allerdings weiterer Informationen über die dreidimensionale Struktur dieser DNA und den tatsächlichen Abstand der Kontaktstellen zwischen DNA und Histon.

Eine Verbiegung des gesamten DNA-Moleküls und eine variable Flexibilität an bestimmten Stellen können durchaus gleichzeitig vorliegen. Die Flexibilität der DNA an der Kontaktstelle mit dem Histonkern muß zwangsläufig um so weniger ausgeprägt sein, je mehr die DNA in der entsprechenden Richtung vorgebogen ist. Wie weit sich beide Eigenschaften der DNA gegenseitig bedingen und in welchem Ausmaß sie für eine spezifische Positionierung verantwortlich sind, kann mit den vorliegenden Daten noch nicht entschieden werden.

3.7. Über den Mechanismus der Nukleosomenpositionierung in vivo.

Obwohl in den letzten Jahren mehr und mehr Beispiele für eine spezifische Anordnung der Nukleosomen im nativen Chromatin gefunden wurden, ist das Ausmaß ihres Vorkommens im Chromatin der Zelle noch nicht überschaubar, und der Mechanismus ihrer Entstehung ist noch Gegenstand kontroverser Diskussionen. Von Kornberg wird die Meinung vertreten, daß die Nukleosomen im Prinzip zufällig über die DNA verteilt sind, eine spezifische Anordnung aber möglich ist, wenn durch die Bindung eines sequenzspezifischen Proteins an die DNA die Bildung von Nukleosomen an dieser Stelle verhindert wird und sich indirekt mit dem Protein als Grenze eine geordnete Nukleosomenverteilung bilden kann (30). Strauss und Varshavsky postulieren, daß ein DNA bindendes Protein eine spezifische Nukleosomenanordnung auf repetitiver DNA durch die stöchiometrische Bindung eines relativ häufig vorkommenden "phasing"-Proteins erreicht wird, das an die DNA und an die Histone bindet und damit die Nukleosomenpositionen direkt vermittelt (31). Dagegen zeigen Rekonstitutionsexperimente, daß die Information, die in der DNA-Sequenz und der Histonstruktur liegt, zur Bildung von Nukleosomen mit definierter Lokalisation in vitro ausreicht (33-35). Wieweit allerdings diese Positionen auch in vivo benutzt werden, blieb offen. Trifonov und Sussman (91) bzw. Zhurkin (92) schließlich beschreiben ein Modell, in dem die Fähigkeit einer DNA sich um den Histonkern zu wickeln, von ihrer Sequenz abhängt und geben Algorithmen an, mit denen man aus der Sequenz einer DNA die thermodynamisch günstigsten Positionen für den Sitz der Nukleosomen vorausberechnen kann. Allerdings sind bis heute keine Vorhersagen gelungen, die überzeugend mit gefundenen Positionen übereingestimmt hätten.

Die verschiedenen Möglichkeiten müssen sich gegenseitig nicht notwendigerweise ausschließen. Arbeiten über die sogenannten DNAase I-hypersensitiven Stellen (17,98,99) geben Anhaltspunkte, die den Mechanismus, wie er von Kornberg postuliert wird, unterstützen. Diese Stellen sind wahrscheinlich frei von Nukleosomen (100) und in ihrer Nachbarschaft wurde in mehreren Fällen eine spezifische Anordnung der Nukleosomen gefunden (22,27,101,102). Die hypersensitiven Stellen könnten also als Ausgangspunkt einer regelmäßigen Nukleosomenanordnung im Sinne des Kornbergschen Modelles dienen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen am Maussatellitenchromatin in der vorliegenden Arbeit zeigen nun, daß die allermeisten Positionen gleichermaßen *in vivo* wie *in vitro* verwendet werden. Es kann eindeutig gezeigt werden, daß ein "phasing"-Protein, wie es Strauss und Varshavsky für die Satelliten DNA aus der Grünen Meerkatze finden, oder ein anderes sequenzspezifisch bindendes Protein, wie es Kornberg postuliert, für die Nukleosomenanordnung im Maussatellitenchromatin nicht notwendig ist.

3.8. Mögliche biologische Bedeutung von spezifischen Nukleosomenpositionen

Die interessanteste Frage, die im Zusammenhang mit der Entdeckung spezifischer Nukleosomenpositionen diskutiert wird, ist ihre Bedeutung für die Funktion der Gene. In den letzten Jahren richtete sich das Augenmerk im Zusammenhang mit der Regulation und Transkription der Gene in verstärktem Maße auf die Struktur des Chromatins, das charakteristische Änderungen abhängig vom Funktionszustand der Gene erfährt (z.B. 99). Zunächst deuteten Transkriptionsversuche *in vitro* darauf hin, daß die Bindung der kodierenden DNA an Histone im Chromatin die Zugänglichkeit für die RNA-Polymerase herabsetzt und damit die Transkription behindert (13), doch zeigten spätere Versuche mit eukaryontischen Polymerasen, daß die Nukleosomenstruktur keineswegs die Transkription verlangsamen muß (14). Durch Nukleosomen kann allerdings die Zugänglichkeit der DNA für DNA-bindende Proteine herabgesetzt werden, wie es z.B. für die Spaltung von Chromatin oder Mononukleosomen mit Restriktionsenzymen gezeigt wurde (103-105). Sicherlich kann das Fehlen einer Nukleosomenstruktur oder eine günstige Position der Nukleosomen das Erkennen von regulatorischen Signalen auf eukaryontischen Genen durch Regulatorproteine erleichtern. Es besitzt z.B. das Ringchromosom des SV40-Virus um den Replikationsstartpunkt, der zugleich Promotorfunktion besitzt, eine nukleosomenfreie Region, von der vermutet wird, daß sie die Bindung von DNA und RNA-Polymerase wesentlich erleichtert (106). Ein möglicher direkter Einfluß der Nukleosomenpositionen auf die Transkription wird von verschiedenen Autoren diskutiert (107-109) und von Wittig und Wittig für ein tRNA-Gen beschrieben (23). Sie stellen ein Modell auf, in dem die Transkription des Genes nur dann möglich ist, wenn das Nukleosom am 5'-Ende in einer bestimmten Position sitzt und der Promotor als Bindungsstelle für die RNA-Polymerase in

der Linker-DNA zu liegen kommt. Jedoch fehlt ein Nachweis dieser Ergebnisse, die mit Rekonstitutionsexperimenten gefunden wurden, für die Situation in der lebenden Zelle.

Das Besondere der Nukleosomenpositionen, wie sie bis jetzt für das Satellitenchromatin von Maus, Ratte und Grüner Meerkatze gefunden wurden (18-21), ist die Vielzahl der möglichen Positionen. Da die Satelliten DNA aus Einheiten besteht, die bis zu 1 Million mal im Genom vorkommen, ist es wahrscheinlich, daß alle Nukleosomenpositionen in einer Zelle vertreten sind. Für eine Gensequenz, die nur einmal in der Zelle vorkommt, aber könnten mehrere zur Auswahl stehende Phasen eine besondere Bedeutung zukommen. Folgendes Modell ist denkbar: durch die Existenz mehrerer alternativer Positionen wird es möglich, in unterschiedlichen Geweben verschiedene Anordnungen der Nukleosomen zu finden, und es kann z.B. ein aktiviertes Gen eine andere Nukleosomenanordnung annehmen als ein inaktives Gen. Die Entscheidung, welche der möglichen Positionen eingenommen werden, ob also ein Gen aktiv wird oder inaktiv bleiben soll, bedarf allerdings eines weiteren Faktors. Darunter ist z.B. ein Regulatorprotein zu verstehen, das durch spezifische Bindung an die DNA bestimmte Positionen verhindern kann und andere zuläßt. Das Modell von Kornberg besagt, daß die Nukleosomenpositionen durch die Position eines spezifisch bindenden Proteins gegeben aber unabhängig von der DNA-Sequenz sind, während in dem hier vorgestellten Modell die DNA-Sequenz eine bestimmte Zahl von Anordnungen zuläßt, aus denen eine Anordnung durch die Anwesenheit eines Regulatorproteins ausgewählt werden kann. Die lokale Situation eines Nukleosoms ist dabei wohl von sekundärer Bedeutung, wichtiger könnte die Möglichkeit sein, über eine gewisse Strecke des Chromatins zwei definierte Nukleosomenanordnungen einrichten zu können, die einmal für "Gen an" und zum anderen für "Gen aus" stehen. Ein Signal, das durch ein regulatorisches Protein gegeben

wird, könnte damit in eine höhere Ordnung von Chromatinstruktur übersetzt werden. Diese Struktur wäre Teil des vielfach beschriebenen aktiven Chromatins (15).

Es bleibt die Frage nach der Bedeutung spezifischer Positionen auf einer nichttranskribierten DNA wie der des Maussatelliten. Im Falle der Satelliten DNA könnte einer regelmäßigen Anordnung der Nukleosomen eine strukturelle Bedeutung zukommen. Diese DNA stellt einen Teil des Heterochromatins im Zellkern dar und liegt normalerweise in kondensierter Form vor. Es ist deshalb vorstellbar, daß eine hochgeordnete Chromatinstruktur, die durch definierte Positionen der Nukleosomen bedingt wird, diese Kompaktheit im wesentlichen bestimmt. Allerdings ist bisher eine biologische Bedeutung spezifischer Positionen noch nicht bewiesen und es braucht, wie durch Experimente mit prokaryontischen pBR322-Fragmenten gezeigt wurde, per se keine solche vorzuliegen. Wohl kann aber eine spezifische Anordnung für die Zelle sekundär diese Bedeutung erlangt haben. Wie weit die Genregulation davon betroffen ist, wird erst die Rekonstitution von Chromatin aus Gen-DNA und deren Transkription in vitro zeigen können, zu der in dieser Arbeit ein Grundstein gelegt wurde.

4. Materialien und Methoden

4.1. Enzyme

Die Restriktionsnukleasen HpaII, Sau96, HaeIII, RsaI, BamHI, EcoRI und PstI, T₄-Polynukleotidkinase, T₄-DNA Ligase, Nuklease S₁, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm, DNA Polymerase I und das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurden von Boehringer, Mannheim bezogen, BstNI, EcoRII und Exonuklease III aus E.coli wurden von New England Biolabs, Beverly, MA, gekauft. Micrococcus-Nuklease und Desoxyribonuklease I stammen von Worthington, Freehold, N.J. und Proteinase K von E.Merck, Darmstadt.

4.2. DNA

EcoRI-Linker DNA wurde von Collaborative Research, Mass. und HindIII-Linker DNA von New England Biolabs, Beverly, MA, gekauft. Hochmolekulare Kalbsthymus DNA wurde von Boehringer, Mannheim, bezogen. Hochmolekulare Maussatelliten DNA wurde aus Mäuseleber isoliert, wie in Ref.110 beschrieben. Monomere Satelliten DNA wurde daraus durch den Verdau von je 50 µg hochmolekularer DNA mit 50 Einheiten der Enzyme EcoRII, Sau96 und BstNI für 2 Std bei den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen erhalten. Der DNA-Längenmarker wurde durch den Verdau von pBR322 DNA mit HpaII gewonnen und die Fragmente an ihrem 5'-Ende mit ³²P markiert. Die Fragmentlängen sind aus der veröffentlichten Sequenz errechnet (64), mit 622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 2 x 160, 2 x 147, 122, 110, 90, 76, 67, 2 x 34, 2 x 26, 2 x 9 Basenpaaren. Die nach partieller Depurinierung als radioaktiver Marker verwendete DNA wurde entwe-

der nach Ref.65 hergestellt oder mit dem radioaktiv markierten DNA-Fragment durch 10 Min Kochen in 90% Formamid, 1 mM EDTA und 15 mM HCl erhalten.

4.3. Radioaktive Markierung und Gelelektrophorese der DNA

Die radioaktive Markierung am 5'-Ende der DNA-Fragmente mit T_4 -Polynukleotidkinase und $\gamma(^{32}\text{P})$ -ATP und die Analyse markierter Fragmente im Sequenzgel erfolgte wie in Ref.111 beschrieben.

$\gamma(^{32}\text{P})$ -ATP wurde nach der Methode von Walseth und Johnson (112) aus trägerfreier $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$, bezogen von NEN, Boston, Mass., synthetisiert. Die Nicktranslation von DNA erfolgte gemäß Ref.113. Die Elektrophorese von DNA unter nichtdenaturierenden Bedingungen wurde ausgeführt wie in Ref.114 beschrieben.

4.4. Markierung von pBR322-Fragmenten an einem 5'-Ende

Das in 2.1.2. verwendete 163 bp EcoRI/RsaI Fragment (Position 4361-164 in der pBR322 Sequenz (64)), das 210 bp RsaI/BamHI Fragment (Position 164-375) und das 239 bp PstI/RsaI Fragment (Position 3608-3846) wurden selektiv an jedem 5'-Ende eines Stranges markiert, indem zunächst je 50 μg pBR 322 DNA mit RsaI gespalten, die drei resultierenden Fragmente an beiden 5'-Enden markiert und mit den Enzymen BamHI, EcoRI und PstI nachgespalten wurde. Es entstehen 6 Fragmente, die jeweils an den RsaI-Enden markiert sind und von denen die drei kleineren Fragmente der oben angegebenen Größe über eine präparative Gelelektrophorese im 5% PAA-Gel isoliert wurden. Die am anderen Ende markierten Fragmente wurden durch die Spaltung der pBR322 DNA mit BamHI, PstI und EcoRI und der Nachspaltung der markierten DNA mit RsaI erhalten.

4.5. Markierung von monomerer Maussatelliten DNA an einem 5'-Ende

1 µg des an beiden 5'-Enden markierten Monomers (EcoRII) wurde in einem Volumen von 20 µl (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 und 2 mM MgCl₂) mit 0.5 Einheiten Klenow-Polymerase und den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (jeweils 10 µM) für 10 Min bei 37° inkubiert. Auf diese Weise werden die überstehenden Einzelstrangenden zum Doppelstrang aufgefüllt und es wird die mit der EcoRII-Stelle überlappende Sau96 Stelle wiederhergestellt, die nun gespalten werden kann. Die Nachspaltung erfolgt zusammen mit der Auffüllreaktion im selben Ansatz, wodurch das neue unmarkierte Ende selbst wieder aufgefüllt wird. Für die Abtrennung der Markierung am anderen Ende wurde das markierte Monomer (Sau96) mit BstNI (ein Isoschizomer von EcoRII) nachgespalten. Die an einem Ende markierten Fragmente, die so erhalten werden, sind in Abb.23 gezeigt.

4.6. Die Präparation oligomerer synthetischer DNA

5 µg der EcoRI-Linker DNA GGAATTC und der HindIII-Linker DNA CAAGCTTG wurden mit γ (³²P)-ATP (2,5 mCi) und 5 Einheiten Polynukleotidkinase inkubiert für 30 Min bei 37° in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM Spermidin und 0,1 mM EDTA in einem Volumen von 10 µl. Nach Inaktivierung des Enzyms bei 70° für 5 Min wurden 1 Einheit T₄-Ligase und 2 µl ATP (1 mM) zugegeben. Die Ligierung erfolgte bei 12° für 1 Std. Die gebildeten oligomeren DNA-Fragmente wurden aus einem 18% Sequenzgel ohne Harnstoff isoliert.

4.7. Die Gleichungen, die den Abbau eines DNA-Fragmentes mit Exonuklease III beschreiben

Der exonukleolytische Abbau eines DNA-Fragmentes A ist eine konsekutive Reaktion vom Typ $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow D \rightarrow E \rightarrow F \rightarrow \dots N$. Jedes Abbauprodukt ist um ein Nukleotid kürzer als das vorhergehende. Ihre Mengen sind der Menge des DNA-Fragmentes A zur Zeit 0 = A_0 proportional und können in Abhängigkeit von der Zeit durch folgende Gleichungen errechnet werden (angegeben für die ersten sechs DNA-Fragmente, s. 2.1.3.):

1. $A = A_0 \exp(-k_1 \cdot t)$
2. $B = k_1 A_0 / (k_2 - k_1) \exp(-k_1 \cdot t) + k_1 A_0 / (k_1 - k_2) \exp(-k_2 \cdot t)$
3. $C = k_1 k_2 A_0 / (k_2 - k_1)(k_3 - k_1) \exp(-k_1 \cdot t) + k_1 k_2 A_0 / (k_1 - k_2)(k_3 - k_2) \exp(-k_2 \cdot t) + k_1 k_2 A_0 / (k_1 - k_3)(k_2 - k_3) \exp(-k_3 \cdot t)$
4. $D = k_1 k_2 k_3 A_0 / (k_2 - k_1)(k_3 - k_1)(k_4 - k_1) \exp(-k_1 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 A_0 / (k_1 - k_2)(k_3 - k_2)(k_4 - k_2) \exp(-k_2 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 A_0 / (k_1 - k_3)(k_2 - k_3)(k_4 - k_3) \exp(-k_3 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 A_0 / (k_1 - k_4)(k_2 - k_4)(k_3 - k_4) \exp(-k_4 \cdot t)$
5. $E = k_1 k_2 k_3 k_4 A_0 / (k_2 - k_1)(k_3 - k_1)(k_4 - k_1)(k_5 - k_1) \exp(-k_1 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 A_0 / (k_1 - k_2)(k_3 - k_2)(k_4 - k_2)(k_5 - k_2) \exp(-k_2 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 A_0 / (k_1 - k_3)(k_2 - k_3)(k_4 - k_3)(k_5 - k_3) \exp(-k_3 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 A_0 / (k_1 - k_4)(k_2 - k_4)(k_3 - k_4)(k_5 - k_4) \exp(-k_4 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 A_0 / (k_1 - k_5)(k_2 - k_5)(k_3 - k_5)(k_4 - k_5) \exp(-k_5 \cdot t)$
6. $F = k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_2 - k_1)(k_3 - k_1)(k_4 - k_1)(k_5 - k_1)(k_6 - k_1) \exp(-k_1 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_1 - k_2)(k_3 - k_2)(k_4 - k_2)(k_5 - k_2)(k_6 - k_2) \exp(-k_2 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_1 - k_3)(k_2 - k_3)(k_4 - k_3)(k_5 - k_3)(k_6 - k_3) \exp(-k_3 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_1 - k_4)(k_2 - k_4)(k_3 - k_4)(k_5 - k_4)(k_6 - k_4) \exp(-k_4 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_1 - k_5)(k_2 - k_5)(k_3 - k_5)(k_4 - k_5)(k_6 - k_5) \exp(-k_5 \cdot t) + k_1 k_2 k_3 k_4 k_5 A_0 / (k_1 - k_6)(k_2 - k_6)(k_3 - k_6)(k_4 - k_6)(k_5 - k_6) \exp(-k_6 \cdot t)$

4.8. Die Isolierung von DNA-Fragmenten mit der präparativen Gelelektrophorese

4.8.1. DNA-Faktionen aus Kalbsthymus

5 mg Kalbsthymus DNA wurde in 20 ml (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM CaCl_2) mit 60 Einheiten Micrococcus-Nuklease für 15 Min bei 37° verdaut. Nach 30 Min Inkubation mit 0.1 mg/ml Proteinase K bei 37° wurde die DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen 96% Äthanol präzipitiert und der präparativen Gelelektrophorese in einem 5% PAA-Gel unterworfen. Das Gel wurde in schmale Streifen geschnitten und die DNA elektro-eluiert.

4.8.2. 145 bp DNA aus Hühnererythrozyten

1 mg Zellkerne aus Hühnererythrozyten wurden in 1 ml (15 mM Tris-HCl, pH 7,4, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 0,15 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, 0,2 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 15 mM β -Mercaptoäthanol, 0,1 mM PMSF, 1,4 mM CaCl_2) für 15 Min bei 37° inkubiert und das lösliche Chromatin aus den Kernen mit 0,5 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,2 mM EDTA extrahiert. Die Histone H1 und H5 wurden mit der Ionenaustauschermethode bei 350 mM NaCl entfernt (115). Das Chromatin (0,25 mg DNA/ml) wurde mit 32 Einheiten/ml Micrococcus-Nuklease für 10 Min bei 37° weiter abgebaut, um Nukleosomenkerne zu erhalten. Nach dem Entfernen der Histone mit Proteinase K (0,1 mg/ml, 37°, 30 Min) wurde die Nukleosomenkern DNA (145 bp) über ein 5% PAA-Gel isoliert. Dazu werden die ausgeschnittenen Gelstückchen mit der DNA durch ein Nylonnetz mit der Maschenweite 80 μm (NY 80 HD, Scrynel der Firma ZBF Rüslikon, Schweiz) zentrifugiert und über Nacht bei 4° in 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA eluiert.

4.9. Die Isolierung der Histone H2A+H2B und H3+H4

Die Histone wurden aus Hühnererythrozyten isoliert entsprechend der Ref.116 mit einigen Modifikationen. Lösliches Chromatin (s. 4.8.2.) wurde in 400 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF an eine Hydroxyapatitsäule gebunden und mit einem Salzgradienten von 0,5 - 2 M NaCl eluiert, anstelle der stufenweisen Elution in Ref.116. Zum Konzentrieren wurden die Histon-Fractionen an eine kleine Menge Hydroxyapatit adsorbiert und mit 2 M NaCl in einer Konzentration von etwa 2 mg/ml eluiert. Die Messung der Histonkonzentration erfolgte anhand der Extinktion bei 275 nm mit dem Extinktionskoeffizienten von $0,388 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ für H2A+H2B und $0,372 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$ für H3+H4 (117). Die Analyse der Histone wurde mit der SDS-Gelelektrophorese (18% Acrylamid, 0,45% Bisacrylamid) wie in Ref.20 beschrieben, durchgeführt.

4.10. Die Isolierung von Histon H1-freien Mononukleosomen

Lösliches Chromatin aus Mausleberkernen, durch Abbau mit Micrococcus-Nuklease erhalten (s. 4.8.2.), wird einer Rohrzuckergradientenzentrifugation in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSF unterworfen. Die mononukleosomale Fraktion wurde in Aliquots eingefroren und bei -20° gelagert.

4.11. Die Rekonstitution von Nukleosomen

4.11.1. Rekonstitution mit unmarkierter DNA

Histone und DNA wurden in 2 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1,4 mM β -Mercaptoäthanol, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin und 0,1 mM PMSF gemischt und der Salzgradientendialyse unterzogen (s. unten).

4.11.2. Rekonstitution mit radioaktiv markierter DNA

Histon H1-freie Mononukleosomen (0,5-1 mg/ml) wurden als Histonquelle verwendet, mit der radioaktiv markierten DNA wie in 4.11.1. beschrieben, gemischt und in einen Dialyseschlauch (1-8 X 100 FT, Union Carbide Corp., Chicago, USA) überführt (20-50 μ l mit einer Mononukleosomenkonzentration von 0,1-0,2 mg/ml). Während der Dialyse wurde die NaCl-Konzentration kontinuierlich über Nacht von 2 M auf 0 M verringert (Pufferzusammensetzung am Ende der Dialyse: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1,4 mM β -Mercaptoäthanol). Die Apparatur, die dazu verwendet wird, ist in Abb.34A gezeigt. Den Verlauf der Dialyse zeigt Abb.34B, in der die Verringerung der NaCl-Konzentration in Abhängigkeit von der Dialysezeit aufgetragen ist.

Abb.34 Rekonstitution durch kontinuierliche Dialyse.

A. Apparatur zur Erzeugung eines exponentiellen Salzgradienten für die kontinuierliche Rekonstitution von Nukleosomen.

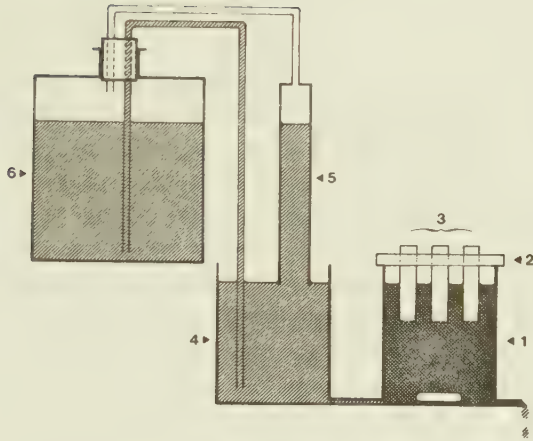
Die Apparatur ist zusammengesetzt aus einem Gradientenmischer mit Dialysekammer (1) und Niveaubehälter (4), sowie einer Vorratsflasche (6) für den Dialysepuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 1,4 mM B-Mercaptoethanol). Verbunden sind Vorratsflasche und Gradientenmischer über einen Zulauf und einen Niveaugregler (5), der aus einem weitleumigen Plexiglasrohr besteht. Durch dieses Rohr strömt beim Sinken des Pufferspiegels in (4) Luft in die Vorratsflasche (6) nach, bis der Zulauf aus (6) den Pufferspiegel im Niveaubehälter (4) so hoch steigen läßt, daß das Rohr wieder verschlossen wird. Vom Deckel (2) der Dialysekammer (1) hängen die Dialyseschläuche (3) mit den Proben in die Kammer. Zu Beginn der Dialyse enthält der Puffer in der Kammer 2 M NaCl. Durch das kontinuierliche Austropfen des Puffers sinkt der Flüssigkeitsspiegel, aus dem Niveaubehälter (4) fließt NaCl-freier Puffer nach und wird durch einen Magnetrührer mit dem Puffer in (1) durchmischt, der dadurch verdünnt wird. Das in (4) gesunkene Niveau wird durch den oben erwähnten Mechanismus aus der Vorratsflasche wieder ausgeglichen. Die Proben werden dabei während der Dialyse, deren Verlauf in B gezeigt ist, einer NaCl-Konzentration von 2 M $\sim$ 0 M ausgesetzt. Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 1 Tropfen/sec (etwa 0,2 l/Std) ist die Dialyse nach 14 Std (über Nacht) beendet und eine NaCl-Konzentration von weniger als 10 mM erreicht.

Maße: Dialysekammer und Niveaubehälter haben beide einen Durchmesser von 9,2 cm und eine Höhe von 10 cm, der Niveaugregler hat die Maße 1,5 X 25 cm und die Vorratsflasche faßt 2,5 l.

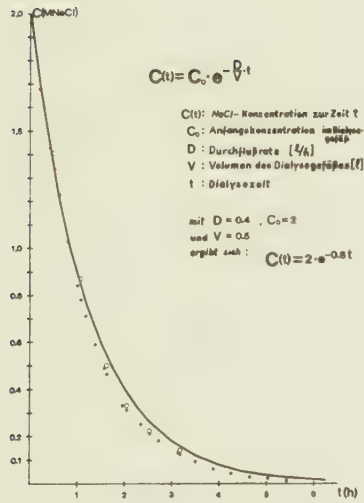
B. Verlauf des NaCl-Gradienten während der Dialyse.

Es ist die NaCl-Konzentration (Molar) gegen die Dialysezeit t (Std) aufgetragen. Die durchgezogene Kurve gibt den theoretischen Verlauf an, wie er durch die Gleichung $C(t) = 2 \exp(-0,8t)$ beschrieben wird (Bedeutung der Symbole und Zahlen s. Abbildung). Die Punkte geben die NaCl-Konzentrationen an, die in der Dialysekammer in Abhängigkeit von der Dialysezeit gemessen wurden, die Kreise sind die dazugehörigen NaCl-Konzentrationen in den Dialyseschläuchen.

Der Gleichung in B liegt die Differentialgleichung $dC(t)/dt = -D/V C_0$ zugrunde, die sich aus der Proportionalität der Abnahme der NaCl-Konzentration in der Dialysekammer $-C(t)/dt$ mit C_0 , D und $1/V$ ergibt.



A



B

4.12. Nukleoproteingelelektrophorese

Die Elektrophorese von rekonstituiertem Material und nativem Chromatin erfolgte mit einem PAA-Gel (4% Acrylamid, 0,1% Bisacrylamid) nach Ref.71 mit leichten Modifikationen. Der Gelpuffer besteht aus 6,4 mM Tris, 3,2 mM Na-acetat, 0,32 mM EDTA, 20% Glyzerin (mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt). Der Elektrophoresepuffer entspricht dem Gelpuffer, allerdings ohne Glyzerin. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für die Dauer von 4-5 Std. Danach wurde das Gel entweder mit Ethidiumbromid (1 µg/ml) angefärbt oder ein Autoradiogramm bei 4° angefertigt.

4.13. Die Isolierung rekonstituierter Partikel aus dem Nukleoproteingel

Am Ende der Salzgradientendialyse wird der Dialysepuffer auf 20% Glyzerin eingestellt, das rekonstituierte Material eine weitere halbe Stunde dialysiert und der Nukleoproteingelelektrophorese unterworfen. Von dem Gel wird ein Autoradiogramm angefertigt (1-3 Std bei 4°), die Banden der rekonstituierten Partikel werden auf der Grundlage dieses Autoradiogrammes ausgeschnitten und die Gelstückchen zerkleinert, indem sie durch ein Nylonnetz zentrifugiert werden (s. 4.8.2.). Diese Gelmasse wird dann in 2 Volumen 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,1 mM PMSE, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin suspendiert und über Nacht bei 4° stehen lassen. Nach Zentrifugation und zwei Waschvorgängen mit demselben Puffer können 60-95 % des Materials im Überstand gewonnen werden.

4.14. Nukleaseabbau von DNA und rekonstituierten Mononukleosomen

Der Abbau mit Exonuklease III aus *E.coli* wurde bei 37° ausgeführt in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 1mM B-Mercaptoäthanol und einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Beim Abbau radioaktiv markierten Materials wurde eine Konzentration von 25 µg/ml mit gescherter Lachs DNA (200-400 bp) eingestellt. Nuklease S1 Abbau von DNA erfolgte mit 5000 Einheiten/ml Enzym bei 20° für 10 Min in einem Puffer, der 250 mM NaCl, 25 mM Na-acetat, pH 4,6, 1 mM Zn-sulfat enthält, bei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die Deproteinisierung von Exonuklease III-behandelten Mononukleosomen wurde mit 0,1 mg/ml Proteinase K für die Dauer von 30 Min bei 37° in 0,2% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 1 mM EDTA durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Struktur des Chromatins, insbesondere der Anordnung ihrer Grundeinheit, der Nukleosomen, auf der DNA. Nachdem Beispiele gefunden wurden, in denen Nukleosomen im Chromatin nicht statistisch verteilt sind, sondern spezifische Positionen relativ zur DNA-Sequenz einnehmen, stellte sich die Frage nach der Bedeutung und dem Zustandekommen dieser spezifischen Positionierung. Es wurde diskutiert, ob spezifische Faktoren wie DNA-bindende Proteine oder aber die DNA-Sequenz alleine dafür verantwortlich sind.

In dieser Arbeit wurde nun mit der Methode der in vitro Rekonstitution von Nukleosomen dieser Frage nachgegangen. Am Beispiel der Satelliten DNA aus der Maus konnte gezeigt werden, welche Rolle die Nukleotidsequenz dieser DNA für die Positionen der Nukleosomen im nativen Chromatin spielt. Dabei gelang es zum ersten Mal für eine definierte DNA, die bekannte Nukleosomenanordnung in vivo mit in vitro Daten zu ergänzen und aus dem Vergleich Aussagen darüber zu machen, wie eine spezifische Nukleosomenanordnung im Zellkern zustande kommt.

Um die Position eines Nukleosoms zu bestimmen, erwies sich die Analyse mit Exonuklease III als vorteilhafte Methode. Dieses Enzym kann DNA, die an Histone gebunden ist, nicht verdauen und aus der Länge der geschützten DNA-Fragmente ist es möglich, die Position des Nukleosoms zu ermitteln. Vor der Anwendung des Enzyms zu diesem Zwecke wurde untersucht, ob die Enzymverdauung bereits von der Nukleotidsequenz der DNA beeinflusst wird. Darüber lagen bisher keinerlei Daten vor und davon konnte es abhängen, ob das Enzym für diese Versuche verwendbar war. Die Untersuchungen dazu ergaben tatsächlich eine sequenzabhängige Abspaltung der Nukleotide. Die Exonuklease III spaltet das Nukleotid C

rasch und G langsam ab, während A und T in ihrer Empfindlichkeit dazwischen liegen. In einer quantitativen Analyse konnten die Unterschiede in der Spaltungsgeschwindigkeit verschiedener Dinukleotidbindungen bestimmt werden, für die maximal ein Faktor 3 gemessen wurde. Die Sequenzspezifität der Exonuklease III stört die Analyse von Nukleosomenpositionen nicht in dem Maße, wie es für andere zu diesem Zwecke verwendete Enzyme gezeigt wurde, da das Enzym durch die Histonbindung an die DNA fast vollständig gehemmt wird und der Einfluß der Nukleotidsequenz auf das Enzym bei weitem übertroffen wird.

Neu bei der Rekonstitutionsmethode, die in dieser Arbeit vorgestellt wird, ist die Verwendung von Mononukleosomen als Histonquelle. Das radioaktiv markierte DNA-Fragment, welches zu Nukleosomen rekonstituiert werden soll, wird einem 20-50 fachen Überschuß an unmarkierten Mononukleosomen zugemischt und auf 2M NaCl gebracht. Unter diesen Bedingungen dissoziieren die Nukleosomen in DNA und Histonoktamere und bilden sich während der Dialyse, bei der die NaCl-Konzentration kontinuierlich erniedrigt wird, wieder zurück. Dabei binden Histonoktamere auch an die radioaktive DNA-Probe. Am Ende der Dialyse, wenn alles NaCl entfernt ist, liegt der größte Teil der markierten DNA in Nukleosomen verpackt vor. Mit der Verwendung von Mononukleosomen als Histonquelle konnte das Problem der richtigen Stöchiometrie der Histone untereinander und zur DNA, das bei dem herkömmlichen Verfahren der Rekonstitution auftrat, auf einfache Weise gelöst werden.

Es wurden Mononukleosomen mit DNA im Größenbereich von 160-260 bp rekonstituiert, weil einerseits die Ergebnisse anderer Autoren zeigten, daß DNA, die kleiner als 160 bp ist, für die Bestimmung von sequenzabhängigen Positionen des Nukleosoms nicht geeignet ist und andererseits ab 260 bp bereits die Bildung von kompakten Dinukleosomen zu erwarten ist. Mit den DNA-Fractionen aus Kalbsthymus von

200-260 bp wurden nach der Rekonstitution drei Partikel gefunden, die sich in der Gelelektrophorese auftrennen ließen. Im ersten Partikel (M1) war das Histonoktamer stets mit den terminalen 145 bp an beiden Enden der DNA verbunden, was auf einen DNA-Endeffekt zurückgeführt wurde, der unabhängig von der Sequenz der DNA ist. Ein solcher Endeffekt war von anderen schon für DNA bis zu einer Größe von 161 bp gefunden worden. Beim zweiten Partikel (M2) nimmt das Histonoktamer interne Positionen ein und unterliegt nicht dem Einfluß der DNA-Enden. Beide Partikel M1 und M2 unterscheiden sich lediglich in der Position des Histonoktamers, während im dritten Partikel (M3) die DNA mit mehr als einem Histonoktamer assoziiert ist. Für eine Untersuchung über den Einfluß der DNA-Sequenz auf die Position des Histonoktamers kam aus diesen Gründen nur Partikel M2 in Frage.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse mit nicht sequenzeinheitlicher DNA wurden Rekonstitutionsexperimente mit Satelliten DNA der Maus durchgeführt. Diese hochrepetitive DNA besteht aus etwa 1 Million Monomere von 234 bp mit bekannter Sequenz, die wiederum substrukturiert sind und eine innere 9 bp Wiederholungseinheit besitzen. Mit dem 234 bp monomeren Satellitenfragment konnten drei Partikel rekonstituiert werden, die in ihrer Zusammensetzung den mit DNA-Fractionen aus Kalbsthymus erhaltenen M1-M3 entsprechen. Die Analyse des Partikels M2 mit Exonuklease III ergab acht verschiedene Nukleosomenpositionen, die mit einer Genauigkeit von ± 1 bp bestimmt werden konnten. Sie sind perfekt in Phase mit der internen 9 bp Wiederholungseinheit, d.h. etwa alle 9 bp findet sich eine bevorzugte Position. Diese spezifische Wechselwirkung zwischen Histon und DNA hängt, wie Experimente mit Histonen aus Maus und Huhn zeigen, nicht von der Verwendung homologer Histone ab.

Vielmehr scheint die in beiden Tierarten konservierte Struktur der Histone für die spezifische Wechselwirkung zu genügen.

Um herauszufinden, ob diese multiplen spezifischen Nukleosomenpositionen nur eine Besonderheit der Satelliten DNA sind, wurde ein prokaryontisches Restriktionsfragment von ebenfalls 234 bp Länge mit Histonen der Maus rekonstituiert. Auch für diese DNA, die in vivo nicht in Nukleosomenstruktur vorliegt, wurde eine Anzahl verschiedener, definierter Nukleosomenpositionen gefunden. So scheinen multiple spezifische Phasen nicht eine Eigenschaft der Satelliten DNA alleine, sondern ein allgemeines Prinzip der Histon-DNA Wechselwirkung zu sein.

Die Maussatelliten DNA ist der erste Fall, für den Informationen über die Anordnung der Nukleosomen sowohl im nativen Chromatin als auch in vitro vorliegen. Der Vergleich der Positionen der rekonstituierten Nukleosomen mit denen im nativen Maussatellitenchromatin zeigt, daß die meisten Positionen identisch sind. Diese Übereinstimmung macht den Schluß wahrscheinlich, daß auch die spezifische Positionierung in vivo primär von der Sequenz der Satelliten DNA bestimmt ist, wie es für die Positionierung in vitro der Fall ist, und dafür weder Nichthistonproteine noch andere Kernfaktoren benötigt werden. Darüberhinaus wird aber auch deutlich, daß Einflüsse weiterer Faktoren eine gewisse Rolle spielen, da in vivo eine zusätzliche Position vorliegt, andererseits zwei in vitro gefundene fehlen. Es wäre möglich, daß die hochgeordnete Struktur des Chromatins, wie sie im heterochromatischen Zustand der Satelliten DNA im Zellkern vorliegt, für diese Unterschiede verantwortlich ist. Dennoch machen die Ergebnisse den grundlegenden Einfluß deutlich, den die Nukleotidsequenz der DNA auf die Anordnung der Nukleosomen und damit auf die Chromatinstruktur hat.

Zur Frage, wie eine sequenzspezifische Nukleosomenanordnung vermittelt werden kann, wird deutlich, daß die Sequenz der DNA die Nukleosomenpositionen nicht über eine direkte Wechselwirkung zwischen Histon und Nukleobasen bestimmt, sondern wahrscheinlich über die sequenzabhängige Geometrie des DNA-Rückgrates. Einmal deuten mehrere Befunde darauf hin, daß die Satelliten DNA gebogen ist und dies die Positionen, die in vitro gefunden wurden, beeinflußt. Andererseits finden sich deutliche Hinweise, daß der Kontakt des Histonkerns mit Sequenzen, die wenig flexibel sind, vermieden wird. Dies wird von neueren Röntgenstrukturdaten vom Nukleosom unterstützt, die zeigen, daß die nukleosomale DNA an einigen Stellen, wo sie an den Histonkern bindet, eine besonders große Flexibilität besitzen muß.

6. Literaturverzeichnis

1. Hewish, D.R. und Burgoyne, L.A., Biochem. Biophys. Res. Commun. **52**, 504-510 (1973)
2. Kornberg, R.D., Science **184**, 868-871 (1974)
3. Olins, A.L. und Olins, D.E., Science **183**, 330-332 (1974)
4. Noll, M., Nature **251**, 249-251 (1974)
5. Renz, M., Nehls, P. und Hozier, J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 1879-1883 (1977)
6. Strätling, W.H., Müller, U. und Zentgraf, H., Exp. Cell Res. **117**, 301-311 (1978)
7. Thoma, F. Koller, Th. und Klug, A., J. Cell Biol. **83**, 403-427 (1979)
8. Benyajati, C. und Worcel, A., Cell **9**, 393-407 (1976)
9. Paulson, J.R. und Laemmli, U.K., Cell **12**, 817-828 (1977)
10. Igo-Kemenes, T. und Zachau, H.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **42**, 109-118 (1977)
11. Mirkovitch, J., Mirault, M.-E. und Laemmli, U.K., Cell **39**, 223-232 (1984)
12. Jacob, F. und Monod, J., J. Mol. Biol. **3**, 318-356 (1961)
13. Elgin, S.R.C. und Weintraub, H., Ann. Rev. Biochem. **44**, 725-774 (1975)
14. Mathis, D., Oudet, P. und Chambon, P., Progr. Nucl. Acids Res. Mol. Biol. **24**, 1-55 (1980)
15. Igo-Kemenes, T., Hörz, W. und Zachau, H.G., Ann. Rev. Biochem., **51**, 89-121 (1982)
16. Zachau, H.G. und Igo-Kemenes, T., Cell **24**, 597-598 (1981)

17. Cartwright, I.L., Keene, M.A., Howard, G.C., Abmayr, S.M., Fleischmann, G., Lowenhaupt, K. und Elgin S.C. R., CRC Crit. Rev. Biochem. **13**, 1-86 (1982)
18. Musich, P.R., Brown, F.L. und Maio, J.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 118-122 (1982)
19. Zhang, X.Y. und Hörz, W., J. Mol. Biol. **176**, 105-129 (1984)
20. Zhang, X.Y. und Hörz, W., Nucl. Acids Res. **10**, 1481-1494 (1982)
21. Böck, H., Abler, S., Zhang, X.Y., Fritton, H. und Igo-Kemenes, T., J. Mol. Biol. **176**, 131-154 (1984)
22. Bloom K.S. und Carbon, J., Cell **29**, 305-317 (1982)
23. Wittig, S. und Wittig, B., Nature **297**, 31-38 (1982)
24. Worcel, A., Gargiulo, G., Jessee, B., Udvardy, A., Louis, C. und Schedl, P., Nucl. Acids Res. **11**, 421-439 (1983)
25. Young, D. und Carroll, D., Mol. Cell. Biol. **3**, 720-730 (1983)
26. Wu, K.C., Strauss, F. und Varshavsky, A., J. Mol. Biol. **170**, 93-117 (1983)
27. Palen T.E. und Cech, T.R., Cell **36**, 933-942 (1984)
28. Gottschling, D.E. und Cech, T.R., Cell **38**, 501-510 (1984)
29. Thoma, F., Bergman, L.W. und Simpson, R.T., J. Mol. Biol. **177**, 715-733 (1984)
30. Kornberg, R., Nature **292**, 579-580 (1981)
31. Strauss, F. und Varshavsky, A., Cell **37**, 889-901 (1984)
32. Wasylyk, B., Oudet, P. und Chambon, P., Nucl. Acids Res. **7**, 705-713 (1979)
33. Chao, M.V., Gralla, J. und Martinson, H.G., Biochemistry **18**, 1068-1074 (1979)
34. Ramsay, N., Felsenfeld, G., Rushton, B.M und McGhee, J.D., EMBO J. **3**, 2605-2611 (1984)

35. Simpson, R.T. und Stafford, D.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 51-55 (1983)
36. Kit, S., J. Mol. Biol. **3**, 711-716 (1961)
37. Brutlag, D.L., Ann. Rev. Genet. **14**, 121-144 (1980)
38. Singer, M., Int. Rev. Cytol. **76**, 67-112 (1982)
39. Doolittle, W.F. und Sapienza, C., Nature **284**, 601-603 (1980)
40. Orgel, L.E. und Crick, F.H.C., Nature **284**, 604-607 (1980)
41. Richards, B.M. und Pardon, J.F., Exp. Cell Res. **62**, 184-196 (1970)
42. Axel, R., Melchior, W.Jr., Sollner-Webb, B. und Felsenfeld, G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **71**, 4101-4105 (1974)
43. Oudet, P., Gross-Bellard, M. und Chambon, P. Cell **4**, 281-300 (1975)
44. Laskey, R.A. und Earnshaw, W.C., Nature **286**, 763-767 (1980)
45. Steinmetz, M., Streeck, R.E. und Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. **83**, 615-628 (1978)
46. Stein, A. und Künzler, P., Nature **302**, 548-550 (1983)
47. Stein, A. und Bina, M., J. Mol. Biol. **178**, 341 (1984)
48. Weischat, W.O. und Van Holde, K.E., Nucl. Acids Res. **8**, 3743-3755 (1980)
49. Riley, D. und Weintraub, H., Cell **13**, 281-293 (1978)
50. Richardson, C.C., Lehman, R. und Kornberg, A., J. Biol. Chem. **239**, 251-258 (1964)
51. Thomas, K.R. und Olivera, B.M., J. Biol. Chem. **253**, 424-429 (1978)
52. Prunell, A. und Kornberg, R.D., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **42**, 103-108 (1977)
53. Dingwall, C., Lomonosoff, G.P. und Laskey, R.A., Nucl. Acids Res. **9**, 2659-2673 (1981)

54. Hörz, W. und Altenburger, W., Nucl. Acids Res. **9**, 2643-2658 (1981)
55. Tatchell, K. und Van Holde, K.E., Biochemistry **18**, 2871-2880 (1979)
56. Richardson, C.C. und Kornberg, A., J. Biol. Chem. **239**, 242-250 (1964)
57. Shalloway, D., Kleinberger, T. und Livingston, D.M., Cell **20**, 411-422 (1980)
58. Schreier, P.H., Davies, R.W. und Kotewicz, M.L. FEBS Lett. **109**, 159-163 (1980)
59. Igo-Kemenes, T., Omori, A. und Zachau, H.G., Nucl. Acids Res. **8**, 5377-5390 (1980)
60. Hörz, W. und Zachau, H.G., J. Mol. Biol. **144**, 305-327 (1980)
61. Prunell, A. und Kornberg, R.D., J. Mol. Biol. **154**, 515-523 (1982)
62. Smith, M.R. und Lieberman M.W., Nucl. Acids. Res. **12**, 6493-6510 (1984)
63. Guo, L.-H. und Wu, R., Nucl. Acids Res. **10**, 2065-2084 (1982)
64. Sutcliffe, J.G., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **43**, 77-90 (1978)
65. Gray, C.P., Sommer, R., Polke, C., Beck, E. und Schaller, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 50-53 (1978)
66. Bateman, H., Proc. Camb. Phil. Soc. **15**, 423-427 (1910)
67. Frank, R., Müller, D. und Wolff, C., Nucl. Acids Res. **9**, 4967-4979 (1981)
68. Marquardt, D.W., J. Soc. ind. appl. Math. II, **2**, 431-441 (1963)
69. Sandeen, G., Wood, W.I. und Felsenfeld, G., Nucl. Acids Res. **8**, 3757-3778 (1980)
70. Varshavsky, A.J., Bakayev, V.V. und Georgiev G.P., Nucl. Acids Res. **3**, 477-492 (1976)

71. Albright, S.C., Wiseman, J.M., Lange, R.A. und Garrard, W.T., J. Biol. Chem. **255**, 3673-3684 (1980)
72. Simon, R.H., Camerini-Otero, R.D. und Felsenfeld, G., Nucl. Acids Res. **5**, 4805-4818 (1978)
73. Stockley, P.G. und Thomas, J.O., FEBS Lett. **99**, 129-135 (1979)
74. Dickerson, R.E. und Drew, H.R. J. Mol. Biol. **149**, 761-786 (1981)
75. Lomonossoff, G.P., Butler, P.J.G. und Klug, A., J. Mol. Biol. **149**, 745-760 (1981)
76. Drew, H.R., J. Mol. Biol. **176**, 553-557 (1984)
77. Simpson, R.T. und Künzler, P., Nucl. Acids Res. **6**, 1387-1415 (1979)
78. Rhodes, D., Nucl. Acids Res. **6**, 1805-1816 (1979)
79. Simpson, R.T. und Shindo, H., Nucl. Acids Res. **7**, 481-492 (1979)
80. Saragosti, S., Moyne, G. und Yaniv, M., Cell **20**, 65-73 (1980)
81. Jakobovits, E.B., Bratosin, S. und Aloni, Y., Nature **285**, 263-265 (1980)
82. Tatchell, K. und Van Holde, K.E., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3583-3587 (1978)
83. Strauss, F. und Prunell, A., Nucl. Acids Res. **10**, 2275-2293 (1982)
84. Lutter, L.C., J. Mol. Biol. **124**, 391-420 (1978)
85. Noll, M., J. Mol. Biol. **116**, 49-71 (1977)
86. Hörz, W. und Altenburger, W. (1981) Nucl. Acids Res. **9**, 683-696 (1981)
87. Weischet, W.O., Tatchell, K., Van Holde, K.E. und Klump, H., Nucl. Acids Res. **5**, 139-160 (1978)
88. Shick, V.V., Belyavski, A.V., Bavykin, S.G. und Mirzabekov, A.D., J.Mol.Biol. **139**, 491-517 (1980)
89. Dickerson, R.E., Drew, H.R., Conner, B.N., Wing, R. M., Fratini, A.V. und Kopka, M.L., Science **216**, 475-485 (1982)

90. Drew, H.R., J. Mol. Biol. **176**, 535-557 (1984)
91. Drew, H.R. und Travers, A.A., Cell **37**, 491-502 (1984)
92. Trifonov, E.N. und Sussman, J.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 3816-3820 (1980)
93. Zhurkin, V.B., FEBS Lett. **158**, 293-297 (1983)
94. Wu, H.-M. und Crothers, D.M., Nature **308**, 509-513 (1984)
95. Prunell, A., EMBO J. **1**, 173-179 (1982)
96. Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D. und Klug, A., Nature **311**, 532-537 (1984)
97. Kunkel, G.R. und Martinson, H.G., Nucl. Acids Res. **9**, 6869-6888 (1981)
98. Elgin, S.C.R., Cell **27**, 413-415 (1981)
99. Fritton, H.P., Igo-Kemenes, T., Strech-Jurk, U., Theisen, M. und Sippel, A.E., Nature **311**, 163-165 (1984)
100. Elgin, S.C.R., Nature **309**, 213-214 (1984)
101. Udvardy, A. und Schedl, P., J. Mol. Biol. **172**, 385-403 (1984)
102. Thoma, F., Bergman, L.W. und Simpson, R.T., J. Mol. Biol. **177**, 715-733 (1984)
103. Pfeiffer, W., Hörz, W., Igo-Kemenes, T. und Zachau, H.G., Nature **258**, 450-452 (1975)
104. Linxweiler, W. und Hörz, W., Nucl. Acids Res. **12**, 9395-9413 (1984)
105. Weischet, W.O., Glotov, B.O., Schnell, H. und Zachau, H.G., Nucl. Acids Res. **10**, 3627-3645 (1982)
106. Tjian, R., Cell **26**, 1-2 (1981)
107. Louis, C., Schedl, P., Samal, B. und Worcel, A., Cell **22**, 387-392 (1980)
108. Levy, A. und Noll, M., Nucl. Acids Res. **8**, 6059-6068 (1980)
109. Gottesfeld, J.M. und Bloomer, L.S., Cell **21**, 751-760 (1980)

- 110. Hörz, W. und Zachau, H.G., Eur. J. Biochem. **73**, 383-392 (1977)
- 111. Maxam, A.M. und Gilbert, W., Meth. Enzymol. **65**, 499-560 (1980)
- 112. Walseth, T.F. und Johnson, R.A., Biochim. Biophys. Acta **562**, 11-31 (1979)
- 113. Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. und Berg, P., J. Mol. Biol. **113**, 237-251 (1977)
- 114. Hörz, W. und Zachau, H.G., J. Mol. Biol. **144**, 305-327 (1980)
- 115. Hörz, W., Miller, F., Klobeck, G. und Zachau, H.G., J. Mol. Biol. **144**, 329-351 (1980)
- 116. Simon, R.H. und Felsenfeld, G., Nucl. Acids Res. **6**, 689-696 (1979)
- 117. Steinmetz, M., Dissertation, LMU München (1977)
- 118. Smith, H.O. und Nathans, D., J. Mol. Biol. **81**, 419-423 (1973)

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Bisacrylamid	N,N'- Methylenebisacrylamid
bp	Basenpaar
DNAase I	Desoxyribonuklease I
ds	doppelsträngig
E	Einheiten
HMG-Proteine	Gruppe von Proteinen im Zellkern, die im SDS-Gel besonders schnell wandern (high mobility group).
Min	Minuten
PAA	Polyacrylamid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Ref.	Referenz
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
ss	einzelsträngig
Std	Stunden
SV 40	Simian-Virus 40
t	Zeit
V	Volt

Die Bezeichnung der Restriktionsnukleasen richtet sich nach Referenz 118. Die Abkürzungen für Nukleinsäuren folgen den Regeln der IUPAC-IUB-Kommission, Eur. J. Biochem. **15**, 203-208 (1970); alle anderen Abkürzungen richten sich nach den Empfehlungen, die in Eur. J. Biochem. **74**, 1-6 (1977) gegeben werden.

Lebenslauf

Am 21.6.1953 wurde ich in Werschweiler/Saar geboren. Ab 1960 besuchte ich die Volksschule Werschweiler, von der ich 1966 auf das staatliche Aufbaugymnasium Ottweiler überwechselte, wo ich 1972 die Reifeprüfung bestand. Nach der Ableistung meines Grundwehrdienstes begann ich im WS 1973 das Studium der Chemie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken. Im WS 1974 wechselte ich in das Fach Biochemie an die Eberhard-Karls-Universität in Tübingen über, wo ich 1975 die Vordiplomprüfungen in Biochemie ablegte. Von 1977-78 folgte ein Jahr Gaststudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München im Fachbereich Chemie und Pharmazie mit Fortgeschrittenenpraktikas an der Universität und am MPI für Biochemie in Martinsried. Anschließend setzte ich mein reguläres Studium in Tübingen fort und schloß es 1980 als Diplom-Biochemiker ab mit der unter Anleitung von Dr. Bisswanger am Institut für physiologische Chemie der Universität Tübingen angefertigten Diplomarbeit: "Untersuchungen zur Struktur des Pyruvat-Dehydrogenase Komplexes aus E.coli". Seit dem SS 1980 studiere ich Tiermedizin an der Universität München. Von Juni 1980 bis Dezember 1984 fertigte ich unter Anleitung von Prof. W. Hörz am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Universität München die vorliegende Arbeit an.

